

03062 10
2eq.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**CONTROL DE LA FOSFORILACION
OXIDATIVA EN CELULAS DE
HEPATOMA AS - 30D**

T E S I S

**Que para obtener el Grado de:
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA**

P r e s e n t a:

SARA RODRIGUEZ ENRIQUEZ



MEXICO, D.F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Rafael Moreno Sánchez en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Jurado Asignado:

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Dr. Edmundo Chávez Cossío

Dr. Ricardo Rosales Ledezma

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Dedicatorias

- A mis queridos padres, Prof Carlos Rodríguez Contreras y la Señora Dagoberta Enríquez vda. de Rodríguez, a los que me deberé siempre.
- A mi querido esposo Pedro Antonio, gracias por tu comprensión, apoyo y cariño, que es difícil de encontrar en este mundo de investigación.
- A mis hermanas, Yolo y Rosy porque me enseñaron a visualizar la vida desde varios puntos de vista (desde el hipismo hasta la sofisticación).
- A mis hermanos Chiquis, Lili, Irma, Rubén, Lety, Toño y Jaime; a mis tíos, sobrinos y primos, por haberme apoyado en todo lo que les fue posible.
- A mi segunda familia: Karla, Toño, Laura y Martha . A Diana, Carlos, Roberto y a la abuelita Mayitos, gracias por aceptarme como un miembro de su maravillosa familia.
- A Cirito y Chester donde se encuentran.
- A mis amigos de siempre: Lolita, Pilar, Anita, Callo, las dos Veros, Edith y especialmente José Luis (Wicho).

Especialmente dedico esta tesis a una personita maravillosa que estuvo conmigo durante la elaboración de los experimentos, mi pequeña Samanthita. Gracias hijita, por colmar de alegría nuestra vida y demostrarnos que por tí seríamos capaces de mover montañas.

Agradecimientos

- A el Dr. Rafael Moreno Sánchez, por haberme dado la oportunidad de exponer mis ideas y de llevarlas a cabo (obviamente cuidando de que no se desperdicie material).**
- A el INC., y especialmente al Dr. Edmundo Chávez C. por su apoyo y sus críticas constructivas que permitieron mi formación.**
- A los compañeros del laboratorio de Bioquímica del INC. Especialmente a Conchita y a Ceci García.**
- A los miembros del Jurado por sus valiosos comentarios y críticas.**

***DONDE ESTOY,
SIEMPRE GOTEA
EL TIEMPO...
EL MOVIMIENTO
PIENSA,
Y CASI SIEMPRE
SE FUNDEN
CONCEPTOS***

Máquinas descompuestas (Jorge Ocampo C)

**CONTROL DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA EN CELULAS DE HEPATOMA
AS-30D**

INDICE

	pág
CAPITULO I	
1. Introducción	
Metabolismo intermediario de las células tumorales de rápido crecimiento.....	1
1.1 Formación de acetofna en las células tumorales	6
1.2 El ciclo de Krebs "truncado" en mitocondrias tumorales.....	8
1.3 Implicaciones clínicas de la manipulación del metabolismo energético en las células tumorales.....	13
1.4 Papel del Ca ²⁺ y del Mg ²⁺ en el metabolismo intermediario de las células tumorales.....	14
1.5 Efecto Crabtree en las células tumorales.....	15
1.6 Efecto del gradiente de O ₂ y pH en el desarrollo del tumor.....	17
1.7 Control de la fosforilación oxidativa en las células y las mitocondrias aisladas AS-30D.....	19
2. Objetivos	
2.1 Objetivo general.....	24
2.2 Objetivos particulares.....	24
CAPITULO II	
1. Material y Métodos	
1.1 Conservación y propagación de la línea tumoral AS-30D.....	25
1.2 Aislamiento de las células tumorales AS-30D.....	25
1.3 Determinación de la proteína celular.....	25
1.4 Medición de los diferentes metabolitos intracelulares.....	25
1.5 Determinación del volumen intracelular.....	31

	pág
1.6 Determinación de la concentración de O₂ en el líquido de hepatoma.....	32
1.7 Medición de la respiración celular absoluta.....	32
1.8 Evaluación cuantitativa de los, Ci utilizando la aproximación de Gellerich.....	33
1.9 Determinación del efecto Crabtree en las células tumorales AS-30D.....	34
1.10 Medición de la reducción de piridín nucleótidos citosólicos en el hepatoma AS-30D, en presencia de concentraciones conocidas de glucosa.....	34
1.11 Determinación de la concentración de Ca²⁺ libre citosólica en células de hepatoma AS-30D utilizando el indicador Indo- 1AM.....	35
1.12 Determinación de la concentración de Mg²⁺ libre citosólica en las células de hepatoma AS-30D, utilizando el indicador Mag Fura-2.....	38

CAPITULO III

1. Resultados

1.1 Variación en la concentración de los diferentes metabolitos evaluados en las células de hepatoma AS-30D.....	41
1.2 Determinación de la relación NADH/NAD⁺ citosólica y mitocondrial en células AS-30D.....	45
1.3 Variación de los metabolitos intracelulares en las células AS-30D incubadas en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	46
1.4 Determinación de los coeficientes de control de flujo para la vía de fosforilación oxidativa utilizando la aproximación de	

	pág
Gellerich y cols.....	47
1.5 Evaluación del efecto Crabtree en células tumorales AS-3OD.....	55
1.6 Reducción de piridín nucleótidos en presencia de concentraciones conocidas de glucosa.....	57
1.7 Concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} en células tumorales de AS-3OD.....	58
1.7.1 Concentración de Ca^{2+}	58
1.6.2 Concentración de Mg^{2+}	61

CAPITULO IV

1. Discusión.

1. Metabolismo intermediario de las células tumorales AS-3OD..	64
1.1 Degradación de cuerpos cetónicos, glutamato y glucógeno por las células AS-3OD en ausencia de sustrato oxidable.....	64
1.2 Baja oxidación de piruvato, glutamina y ATP en las células tumorales AS-3OD, en ausencia de sustrato oxidable.....	65
1.3 Cuantificación de los metabolitos en el líquido de ascitis, en ausencia de sustrato oxidable.....	66
1.4 Determinación del estado redox en las células y las mitocondrias de la línea tumoral AS-3OD.....	67
1.5 Determinación de los principales metabolitos consumidos por las células tumorales AS-3OD en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	68
1.6 Determinación del principal punto de control de la fosforilación oxidativa, utilizando la aproximación de Gellerich.....	69

1.7 Papel del Ca^{2+} en el efecto Carbtree en las células tumorales AS-30D.....	71
1.8.Efecto de los diferentes inhibidores de la salida de Ca^{2+} mitocondrial y de retículo endoplásmico en células AS-30D.....	72
1.9 Efecto de los inhibidores de la entrada de Ca^{2+} extracelular.....	73

CAPITULO V

1. Conclusiones.....	74
2. Perspectivas.....	75
3. Bibliografía.....	77
4. Apéndice.....	85

CAPITULO I

Introducción

METABOLISMO INTERMEDIARIO DE LAS CELULAS TUMORALES DE RAPIDO CRECIMIENTO *

Las células tumorales presentan varios estados de diferenciación, que van desde las células poco diferenciadas, con características metabólicas semejantes a las células normales (con velocidades de glucólisis y de crecimiento disminuidas, como los hepatomas de Morris 66, Morris 47C, y Morris 7794A[1]), hasta las células altamente diferenciadas, que presentan un metabolismo diferente al normal (glucólisis y velocidad de crecimiento muy acelerados). Como ejemplos de éstas últimas se pueden citar las líneas celulares ascíticas AS-30D, Ehrlich y la cadena hiperdiploide Ehrlich Lettré, así como también el carcinosarcoma de Walker-256, entre otras. La elevada actividad glucolítica es la característica más común para identificar a las células tumorales, de rápido crecimiento (CTRC), que se refleja por un incremento en la concentración de ácido láctico, aún en presencia de concentraciones ambientales de O_2 . Una elevada glucólisis aeróbica también se ha encontrado en otros tipos celulares no tumorales principalmente proliferativos; el ácido láctico también puede ser formado a partir de glutamina en CTCRC [ver figura 1 (metabolismo de glutamina)] [1,2].

Parece ser que en todos los tipos de tumores estudiados, la glucólisis es una vía que se encuentra estimulada (Ehrlich, hepatoma de Morris, hepatoma de Novikov, AS-30D etc.), aunque no es la única, puesto que otras, como la vía glutaminolítica (Ehrlich, Ehrlich Lettré), la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de lípidos (hepatoma de Novikov, AS-30D, Ehrlich), la síntesis de colesterol (Morris 3924A, AS-30D), la utilización de cuerpos cetónicos (AS-30D), también se encuentran estimuladas. Sin embargo, el comportamiento de algunas vías metabólicas no es el mismo en todos los tipos tumorales. En el caso de Ehrlich y Ehrlich Lettré, la actividad de algunas enzimas del ciclo de Krebs se encuentran disminuidas, así como la

* Parte de esta sección de la Tesis se encuentra en prensa en Archives of Medical Research

oxidación de piruvato; mientras que en AS-SOD la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs se encuentra por arriba de lo normal, y son capaces de oxidar al piruvato a alta velocidad [3].

Por lo tanto, la estimulación o inactivación de algunas vías metabólicas depende grandemente del tipo de línea celular. En la Tabla I se presentan las principales diferencias y semejanzas entre las células tumorales y las células proliferativas normales.

Se ha descrito que en algunas células tumorales de líquido de ascitis (Ehrlich, Ehrlich Lettré), aunque no en todas (AS-SOD), sólo un escaso porcentaje de la glucosa total consumida (1.5%) es transformada a acetil CoA, para entrar al ciclo de Krebs; el 0.7% es utilizada por la vía de las pentosas, el 2% para la síntesis de lípidos y el resto (93%) se acumula como lactato [4].

Parece ser que esta elevada glucólisis es parte de su estrategia metabólica para sobrevivir en ambientes de hipoxia. Las hipótesis propuestas para explicar este fenómeno son:

(a) La existencia de cambios en los patrones isoenzimáticos de dos de las tres enzimas que controlan la vía glucolítica en condiciones normales: la hexocinasa (HK) y la fosfofructocinasa I (PFK-1) [2]. Se ha reportado que la primera se encuentra en altas cantidades y con una actividad mayor de lo normal (1 vs 124 nmol/min/mg prot en hígado y células tumorales H-91, respectivamente) [5]. Al igual que en células normales, la PFK-1 regula parte del flujo glucolítico en células CTRC. Argilés y Soriano [6] encontraron que en carcinoma de Walker-256, la actividad de la PFK-1 aumenta debido a los altos niveles de ácido láctico que incrementan la concentración de H⁺ en el citosol (disminuye el pH), el cual es un modulador positivo de la enzima. Lo anterior puede explicar la baja sensibilidad de la glucólisis al O₂ en células tumorales; es decir, según esta hipótesis no habría un efecto Pasteur (no habría inhibición de la glucólisis por oxígeno, como sucede en células normales), aunque lo anterior no se ha evaluado directamente [6].

Interesantemente, la sobre-expresión de la enzima 6-fosfofructocinasa-1 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* incrementa el flujo glucolítico en condiciones aeróbicas, sin que la glucólisis se vea afectada por las condiciones anaeróbicas [7]; es decir, en ausencia de oxígeno la sobreexpresión de la enzima no tiene efecto sobre el flujo glucolítico, pero en presencia de oxígeno, la sobreexpresión de la enzima

Tabla 1. Principales diferencias y similitudes entre las células normales proliferativas y las células tumorales.

Característica Metabólica	Célula Proliferativa Normal	Célula Tumoral	Referencia
Formación de láctico	↓	↑↑	1,2,5,7
Efecto Pasteur	↓	↓↓	1,5
Glutaminolisis	↑	↑↑	19,20
Oxidación de Piruvato	↑	a) Ehrlich y E. Lettré ↓↓ b) AS-SOD ↑	12,13,15 3,44
Oxidación de Acetoacetato	↑	↑↑	16,17
β-OHbutirato	↓	↓↓	16,17
Actividad de las enzimas del ciclo de Krebs (CK)	↑	a) Ehrlich y E. Lettré ↓↓ b) AS-SOD ↑↑	12,13 3,25
Sensibilidad al Ca ²⁺ de las Enzimas del Ciclo de Krebs	n.r.	a) Ehrlich y E. Lettré (n.r.) b) AS-SOD ↑↑	25
Act. Enzima Máfica	↑	↑↑	23
Lipogénesis	↑	↑↑	2,18
Colesterogénesis	0	↑↑	1,4

Nota: Se compararon las diferentes líneas tumorales de rápido crecimiento y las líneas celulares quiescentes (en fase G₁) con las células normales maduras utilizando los siguientes símbolos: ↑, incremento de 2-3 veces; ↑↑, incremento de 4 veces; ↓, decremento; 0, sin cambio; n.r., no reportado.

produce un incremento considerable en la glucólisis (del 100%). Por tanto, al igual que en células tumorales, el efecto Pasteur (inhibición de la glucólisis por oxígeno) se encuentra severamente disminuido en este tipo celular. Recientemente se ha descrito un gradiente invertido de pH en varias líneas tumorales, que incluyen diferentes tipos de hepatoma. A pesar de la elevada concentración de ácido láctico y en contraste con lo observado en carcinoma de Walker, el pH intracelular siempre permanece constante (pHi=7.1). De hecho, se ha encontrado que el pH intracelular es ligeramente más básico que el extracelular (pHe= 6.8), lo que hace suponer una posible expulsión de ácido láctico y H^+ hacia el espacio extracelular [8].

(b) Por otro lado, Devlin y Boxer [9] propusieron que en el caso de las células proliferativas no tumorales, la glucólisis se acelera debido a la falta de actividad de los sistemas de transferencia de equivalentes reductores del citosol a la mitocondria (conocidos como las "lanzaderas" de aspartato/malato y glicerol-3 P). La hipótesis propone que, debido a que la mayor parte del piruvato se transforma a ácido láctico, con la concomitante utilización de NADH, los sistemas de transferencia se encuentran limitados de su sustrato. Sin embargo, Grivell y cols. [10] han demostrado que, por lo menos en células de Ehrlich, la velocidad de transferencia de equivalentes reductores es similar a la encontrada en células hepáticas normales, dependiendo del sustrato a los que sean expuestas (0.67 μ moles de NADH transportado/ μ g prot./min). Por tanto, los sistemas de transporte de equivalentes reductores no se pueden considerar como el evento que induce la acelerada glucólisis que presenta este tipo de células.

(c) Una tercera hipótesis para explicar la alta producción de ácido láctico propone que la piruvato deshidrogenasa (PDH) mitocondrial, cuya reacción normal es la de oxidar el piruvato a acetil CoA, se encuentra inhibida competitivamente por un metabolito inusual de 4 carbonos, llamado acetoina [11], producto de la descarboxilación no oxidativa del piruvato [$K_i= 41 \mu M$ acetoina y $K_m=16.5 \mu M$ piruvato (dato reportado para AS-SOD)]; de tal forma que al acumularse el piruvato citosólico, éste se transforma en lactato, por una isoenzima de la lactato deshidrogenasa que presenta una actividad mayor que la normal (aprox. 50% más activa). Este metabolito solo ha sido evaluado en Ehrlich y AS-SOD [11,12].

1.1 FORMACION DE ACETOINA EN LAS CELULAS TUMORALES

La formación de acetoína (figura 2) en mitocondrias tumorales ocurre en dos pasos [12,13]:

1) El piruvato que entra a la mitocondria, en intercambio con OH^- [14], es descarboxilado por la PDH tumoral para dar acetil CoA (ver figura 2). Una vez formada la acetil CoA, se le une un acetaldehído activado (el hidroxietil unido covalentemente con la tiamina pirofosfato) dando lugar al diacetil, un precursor inmediato de la acetoína. En la reacción se libera la coenzima A y la tiamina pirofosfato, al parecer en una reacción no enzimática. Las mitocondrias tumorales, a diferencia de las mitocondrias normales, son incapaces de oxidar los aldehídos, debido a que la aldehído deshidrogenasa (AIDH) se encuentra únicamente en el citosol, y sólo oxida aldehídos aromáticos, pero no alifáticos; además, utiliza como coenzima al NAD^+ o al NADP^+ , a diferencia de la normal que solamente utiliza NAD^+ [13]. Parece ser que la reacción no requiere de ATP, pero sí de TPP^+ y Mg^{2+} .

2) El diacetil formado se reduce finalmente a acetoína, utilizando al NADH.

Una vez formada la acetoína en células tumorales, se degrada rápidamente en una reacción fuertemente dependiente de ATP, dando como productos principales pequeñas cantidades de citrato y dos productos no identificados. En hígado, en condiciones patológicas como alcoholismo, la acetoína puede reducirse para dar lugar al 2,3-butanodiol.

Otra diferencia notoria entre la PDH normal y la tumoral, es que la segunda es activada por concentraciones fisiológicas de AMP (de 0.5 a 1 mM), debido a un posible cambio estructural de la isoenzima, siendo este efecto, que no ocurre en tejidos normales, el posible responsable de la producción de acetoína [15].

Como la PDH se encuentra sólo parcialmente inhibida por acetoína y además estimulada por AMP, una fracción del piruvato mitocondrial puede ser transformado a acetil CoA, pero también parte de la acetoína puede dar acetato y éste acetil CoA, con lo cual el ciclo de Krebs puede continuar hacia la formación de citrato.

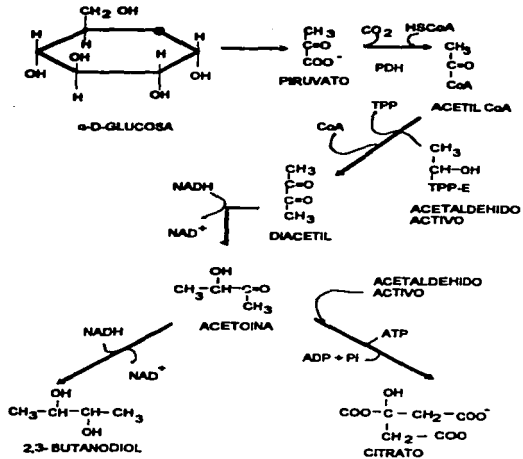


Figura 2. Representación esquemática de la formación de acetoina por las células tumorales a partir de piruvato. Abreviaturas: PDH, complejo de la piruvato deshidrogenasa; HE-TPP-E, complejo enzimático de tiamina pirofosfato. Modificado de [12].

1.2 EL CICLO DE KREBS "TRUNCADO" EN MITOCONDRIAS TUMORALES

El citrato formado por la acetil CoA y el oxaloacetato en células de Ehrlich [13] no se oxida debido a la escasa actividad de la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa, la cual oxida el isocitrato a α -cetoglutarato; por tanto, el citrato es expulsado masivamente de la mitocondria. La salida de citrato a través del acarreador de tricarbocilatos es muy rápida, 4 veces mayor, en comparación con la velocidad del acarreador en mitocondrias normales [4].

Debido a que el citrato es expulsado de la mitocondria, el ciclo de Krebs se encuentra incompleto, por lo menos en mitocondrias de Ehrlich y Ehrlich Letré, por lo que se le ha llamado ciclo de Krebs "truncado". Una vez en el citosol, el citrato es utilizado para la síntesis *de novo* de esteroides, principalmente colesterol (figura 1).

Kelleher y cols. [16], trabajando con hepatoma AS-30D, encontraron que los cuerpos cetónicos, a diferencia de lo que ocurre en los hepatocitos, son metabolizados rápidamente por la célula tumoral. Al parecer, la succinil CoA acetil transferasa, que cataliza el primer paso en la oxidación del acetoacetato a acetoacetil CoA, presenta una actividad 40 veces mayor en las células tumorales que en el hígado (8 vs 334 nmol/min/mg prot en hígado y AS-30D, respectivamente). Estos autores [16] sugieren que el elevado consumo de acetoacetato se debe a la alta demanda de lípidos requeridos por la célula tumoral. Lo anterior fue apoyado por la observación de que cuando se administra acetoacetato en concentraciones fisiológicas (2mM), se da un incremento en la síntesis de lípidos y en la producción de CO_2 , siempre y cuando exista glucosa (5mM) en el medio, lo que indica que el acetoacetato es un metabolito cuyo consumo depende de la glucólisis.

El β -hidroxibutirato, en comparación con el acetoacetato, no es tan fuertemente utilizado por las células de hepatoma AS-30D, debido a que se ha reportado una actividad de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa muy reducida en varias líneas celulares tumorales cuando se compara con hígado normal [17]).

Por otro lado, Kelleher y cols. [16] están convencidos de que la elevada producción de CO_2 observada en AS-30D no es consistente con la hipótesis de Farlo y Coleman [3] del supuesto ciclo de Krebs "truncado", debido a que han encontrado que el CO_2 producido a partir de acetoacetato, acetato y piruvato (estos dos también

medidos en el laboratorio de Kelleher), indica un flujo sustancial de citrato a través del ciclo de Krebs, por lo menos hasta malato (Figura 3).

Las observaciones de Kelleher apoyan los datos de Dietzen y cols. [3], de que por lo menos en AS-SOD el ciclo no es completamente truncado, además de indicar que las unidades de grupos acetilos son suficientes para suministrar los carbonos necesarios para el metabolismo oxidativo durante la lipogénesis.

Otra característica sobresaliente de las células tumorales es la elevada síntesis de esteroides, principalmente colesterol. Una explicación para el aumento en la concentración de este último es la pérdida de control a nivel de una enzima clave de su ruta biosintética *de novo*, la β -hidroximetil glutaril-CoA reductasa [4]. Esta enzima, que transforma hidroximetil glutaril-CoA a mevalonato, no responde a los mecanismos de retroalimentación negativa que existen en los tejidos normales, esto es, no es inhibida alostéricamente por su producto, el colesterol. Parlo y Coleman [4] proponen que la carencia de efecto del colesterol se debe a que el gene de la β -hidroximetilglutaril-CoA reductasa (sensible a colesterol) se expresa en una forma insensible al colesterol. Esta elevada síntesis de colesterol en las membranas tumorales, incluida la membrana mitocondrial, provoca importantes cambios fisiológicos; uno de ellos, observado en mitocondrias intactas, es la disminución de la permeabilidad pasiva a los H^+ [13].

Además, las mitocondrias de hepatoma de Morris 3924A, al igual que Ehrlich, utilizan preferencialmente los esqueletos carbonados del piruvato para la síntesis de colesterol (Figura 1), más que para producir energía (oxidación a CO_2) [18]. Parlo & Coleman [4] y Dietzen & Davis [18], trabajando con células de Ehrlich y AS-SOD respectivamente, reportaron que el incremento de colesterol en la membrana mitocondrial es aproximadamente de 4 a 10 veces mayor al reportado en mitocondrias normales [de 1.9 (normales) a 8 (hepatoma) μg de colesterol/mg proteína] del cual el 87% corresponde a la membrana externa y el resto a la membrana interna. Parlo y Coleman explican que sus datos respaldan la hipótesis del ciclo de Krebs "truncado" propuesto para células de Ehrlich, en donde una elevación del colesterol en las membranas mitocondriales induce alteraciones cinéticas del acarreador de los tricarbóxilatos (aumentando su actividad y restringiendo el metabolismo intramitocondrial de citrato por la aconitasa, en favor de su expulsión al citoplasma). Una vez en el citoplasma, la ATP citrato liasa transforma el citrato a acetil CoA, el cual participa en la síntesis *de novo* de colesterol [18].

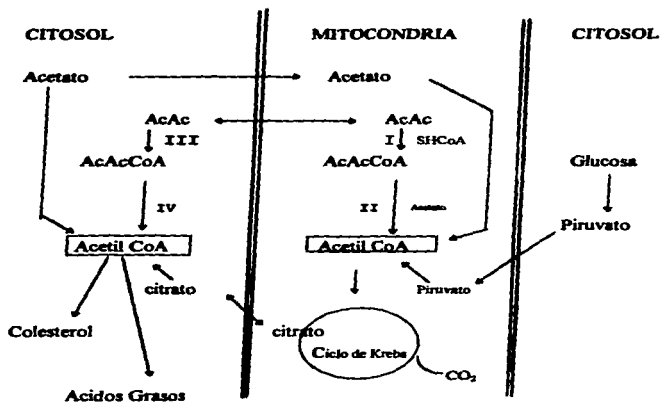


Figura 3. Metabolismo del Acetoacetato (AcAc) en células de hepatoma AS-30D. Los carbonos del AcAc pueden contribuir a la biosíntesis de lípidos por dos vías: 1) la ruta mitocondrial, que involucra la 3-oxiacetil CoA tiolasa (I) y la acetoacetyl CoA tiolasa (II) para producir citrato; y 2) la ruta citosólica, que involucra a la acetoacetyl CoA sintetasa (III) y a la tiolasa citosólica (IV). El acetyl CoA es producido a partir del acetato y piruvato por la acetato tiolasa mitocondrial y la PDH, respectivamente. Aunque no se ha identificado un acarreador específico para AcAc, se sabe que este metabolito atraviesa la membrana de forma protonada.

Para compensar la pérdida de citrato, las células tumorales de Ehrlich y Ehrlich Lettré utilizan vías alternativas para completar su ciclo de Krebs "truncado" [4,12], en particular la vía glutaminolítica, que se ha reportado es muy activa en las CTCR, principalmente a nivel de la glutaminasa y de la glutamil transferasa [19, 20].

La glutamina se ha caracterizado como el principal metabolito combustible en células de Ehrlich y en Ehrlich Lettré, aún en presencia de concentraciones saturantes de glucosa. Su transporte al interior de la mitocondria es más rápido en células

tumorales que en células normales (52nmol/min vs 15nmol/min, respectivamente) [20]. Tanto en mitocondrias tumorales como en normales, la glutamina se desamina para dar glutamato, vía una glutaminasa, la cual es dependiente de fosfato [21]. En hepatocitos, la concentración citosólica de Ca^{2+} libre ($[Ca^{2+}]_c$) estimula la actividad de la glutaminasa [22]; sin embargo, no se conoce si en células tumorales este catión es un activador de la enzima. Una vez formado el glutamato, éste ingresa al ciclo de Krebs a través de reacciones de desaminación catalizadas por la glutamato deshidrogenasa, para formar α -cetoglutarato (Figura 1), el cual continúa el ciclo; el glutamato y principalmente la glutamina son la fuente principal de malato mitocondrial. Éste es transformado a oxaloacetato por una malato DHasa a partir de fumarato (Figura 1) [23]. Por otro lado, el malato exógeno es preferencialmente transformado a piruvato y CO_2 por la enzima málica mitocondrial dependiente de NAD y de $NAD(P^+)$ en células CTRC, para regenerar la fuente de citrato. Es muy posible que esta enzima intramitocondrial se encuentre enlazada a la superficie interna de la membrana interna en estrecha asociación con el sistema de transporte de malato [13,23]. El piruvato formado por la enzima málica (a) puede transformarse en acetolna o acetylCoA, (b) ser expulsado de la mitocondria y en el citosol reducirse a lactato por la lactato deshidrogenasa, ó (c) competir con el piruvato glucolítico por entrar nuevamente a la matriz mitocondrial, para ser oxidado por la piruvato deshidrogenasa dependiente de AMP. Este dato concuerda con la observación de que el malato exógeno potencia la síntesis de citrato, debido a que al transformarse en piruvato, entra al ciclo de Krebs, previa su descarboxilación para dar acetyl CoA y formar citrato [23].

La evidencia de un ciclo de Krebs incompleto hace suponer que en ascitis de Ehrlich, Ehrlich Lettré y hepatoma de Morris 7777, no existe una poza de poder reductor adecuada que impulse la fosforilación oxidativa (<5% NADH [24]), la cual genera el ATP requerido para la biosíntesis de *NOVO* de una serie de metabolitos requeridos por la célula tumoral. Sin embargo, se ha encontrado, que contrario a lo reportado por Parlo y Coleman [4] y Baggetto y cols. [12,13] en células de Ehrlich y Ehrlich Lettré, el ciclo de Krebs en la línea tumoral AS-30D es parecido al encontrado en una mitocondria normal, es decir, con toda su batería enzimática completa y sin ninguna anomalía aparente [3].

Dietzen y cols., en ausencia de Ca^{2+} [3] y Murphy y cols. en presencia de Ca^{2+} [25,26] determinaron que la actividad de algunas enzimas que participan en el ciclo de Krebs de mitocondrias AS-SOD, es aproximadamente 4 veces mayor que la actividad encontrada en mitocondrias normales. Por tanto, el bloque oxidativo de la vía no parecería ser limitante para formar el equivalente reductor (NADH , FADH_2) que alimenta a la cadena respiratoria para la síntesis de ATP y se lleven a cabo todos los procesos celulares dependientes de energía.

Al encontrarse en continuo crecimiento y diferenciación, las células tumorales requieren de un suministro elevado de ATP para llevar a cabo la biosíntesis de nuevas moléculas (principalmente proteínas) y procesos de transporte, que podrían no ser sostenidos únicamente por la vía glucolítica. Müller y cols. [27], han calculado que la cantidad de ATP que se genera en la glucólisis, en células de Ehrlich, en un medio condicionado con aminoácidos durante la fase de proliferación, es sólo del 13%. Por tanto, estos autores [27] proponen que el resto proviene de la fosforilación oxidativa. El punto anterior indica que el suministro de ATP que proviene de la fosforilación oxidativa se requiere en la mayoría de los procesos metabólicos, particularmente para la duplicación celular (Ver Tabla 2). Por tanto, una hipótesis propuesta por nuestro laboratorio es que las células tumorales dependen más de la fosforilación oxidativa que de la glucólisis, durante la proliferación celular.

A este respecto, se ha determinado que en células tumorales de Ehrlich, la transición del estado de reposo a la fase de crecimiento proliferativo, induce una reducción en la generación total de ATP, lo cual correlaciona con la disminución en la vía de fosforilación oxidativa (aproximadamente del 50%), mientras que la glucólisis permanece constante [28]. Se ha determinado también que otros procesos que consumen ATP, como son el recambio de proteínas, la síntesis de RNA y la actividad de las ATPasas de Na^+/K^+ y Ca^{2+} , disminuyen en el estado de reposo celular. En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de ATP consumido durante cada uno de los procesos anteriormente citados.

1.3 IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA MANIPULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN CÉLULAS TUMORALES.

Aunque es concebible que el metabolismo energético y la duplicación celular en algunas células tumorales dependan de ambas vías (tanto glucólisis como fosforilación oxidativa), no es sorprendente que se intente utilizar el metabolismo energético como un blanco para la terapia antineoplásica.

No obstante, se ha observado, en carcinoma de Walker-256, que la inhibición simultánea de ambas vías provoca una reducción del 50% en el crecimiento celular [29]. En estas células tumorales, la disminución en el flujo de la vía glucolítica se llevó a cabo inhibiendo la gluconeogénesis con el 3-mercaptopicolinato (inhibidor de la fosfoenol piruvato carboxilasa) y para bloquear específicamente a la fosforilación oxidativa, se utilizó la rodamina 6G. Es interesante comentar que el tratamiento por separado con rodamina 6G ó 3-mercaptopicolinato no altera la velocidad de crecimiento [29].

Tabla 2. Consumo celular de ATP en células tumorales de rápido crecimiento durante la fase de reposo.

PROCESO	%
Síntesis de proteínas	25-27
Proteólisis	4-8
ATPasa de Na ⁺ /K ⁺	17
Transporte de Ca ²⁺	11-13
Síntesis de RNA	11-13
otros	26

La inhibición específica de la vía glucolítica en algunas células tumorales también se ha llevado cabo utilizando gossipol, un alérido bisnaftaleno polifenólico, que inhibe específicamente a las enzimas dependientes de NAD⁺ y NADP⁺ [30]. En este estudio [30], se inhibió a la fosforilación oxidativa con rodamina 123, sin observar una inhibición total de la velocidad de crecimiento. Al tratar posteriormente a las células con gossipol, la velocidad de crecimiento fue severamente disminuída. Los datos

anteriores demuestran que el gosisol actúa como un agente antineoplásico potencial, que puede ser utilizado experimentalmente en otros tipos tumorales. Sin embargo, no existen datos recientes del uso del gosisol, sugiriendo una posible falla en los resultados.

Por otro lado, también se han llevado a cabo estudios con otro agente antineoplásico, utilizado para la prevención de la lepra: la clofazimina [31]. Este agente citotóxico fue utilizado en una línea celular de carcinoma humano resistente a la quimioterapia, provocando una reducción en el tamaño del tumor. La explicación de tal fenómeno está relacionada con la permeabilidad de la membrana mitocondrial a los H^+ en presencia de este fármaco, lo que provoca un colapso en el gradiente electroquímico, con la concomitante inhibición de la fosforilación oxidativa [31].

1.4 PAPEL DEL Ca^{2+} Y DEL Mg^{2+} EN EL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE LAS CÉLULAS TUMORALES.

Recientemente, Cittadini [32] ha demostrado la existencia de un antiportador Mg^{2+}/Na^+ en células de Ehrlich, muy semejante al encontrado en eritrocitos. Parece ser que este transportador es activado por concentraciones fisiológicas de AMFc (aprox $50 \mu M$) a través de un proceso de fosforilación.

Por otro lado, se ha determinado que en las células tumorales como resultado de la elevación de Ca^{2+} citosólico libre, que ocurre en respuesta a estímulos externos (hormonas ó factores de crecimiento), se produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial ($[Ca^{2+}]_m$) [33,34,35]. El Ca^{2+} entra a la mitocondria tumoral por un uniportador semejante al encontrado en mitocondrias normales, sensible a rojo de ruterio y lantanos; y sale en intercambio con sodio, al igual que en mitocondrias de corazón y cerebro [36].

Se ha determinado que el ATP, a concentraciones micromolares ($100 \mu M$), también provoca un incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ vía la estimulación de un receptor purinérgico llamado P_2 [34,35]. El ATP es un potente agonista de este receptor, cuya activación está asociada a la generación de inositol trifosfato [34], el cual estimula la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico al citoplasma (a una concentración 4 veces por arriba de la basal). Esta salida de Ca^{2+} puede ser repetida por una segunda adición de ATP a la misma concentración, sólo que la respuesta es de menor magnitud. Los

autores proponen que tal efecto es debido a un relleno de las pozas de Ca^{2+} dentro de la célula por un mecanismo sensible a ATP.

Al incrementarse la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ en célula tumoral (AS-30D) se estimulan por lo menos dos de las tres enzimas del ciclo de Krebs que se ha reportado son sensibles al Ca^{2+} en mitocondria normal: la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Figura 1). De esta forma, se da un incremento en la síntesis de ATP necesaria para los procesos demandantes de energía durante la división celular [25,26]. El efecto del Ca^{2+} sobre estas enzimas, tanto en mitocondria tumoral como en la normal es el mismo: disminuir la K_m para sus respectivos sustratos. Estas observaciones apoyan la idea [3] de que en células tumorales de AS-30D, la mitocondria presenta todas sus enzimas funcionales en un ciclo de Krebs completo.

1.5 EFECTO CRABTREE EN LAS CÉLULAS TUMORALES

Se ha encontrado que el Ca^{2+} , aparte de tener un efecto estimulador a nivel de las deshidrogenasas, participa al igual que el Mg^{2+} , en una reacción característica de las células tumorales, llamada efecto Crabtree (mejor conocido como inhibición de la respiración por glucosa y desoxiglucosa), considerado como el efecto contrario al efecto Pasteur. Evtodienco y cols. [37,38] demostraron que en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ libre aumenta de una basal de 170nM hasta 300 nM. Este incremento no es significativo, ya que estas fluctuaciones se encuentran en células normales; sin embargo lo que parece evidente es el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ libre en presencia de glucosa, fenómeno que los autores tratan de explicar proponiendo varias hipótesis:

(A) La existencia de un receptor a glucosa, parecido al de las células β del páncreas, que desarrolla la cascada de reacciones que tienen como consecuencia la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y, por lo tanto, la elevación del Ca^{2+} citoplasmático. Sin embargo, estos autores [37] no muestran los trazos de fluorescencia obtenidos de las células cargadas con el fluoróforo de Ca^{2+} , lo cual es importante para asegurar una buena señal de calibración. Además, la K_d del complejo indicador- Ca^{2+} empleada por este grupo para la cuantificación de Ca^{2+} no es la obtenida bajo sus condiciones experimentales, sino la que se obtiene en solución. La experiencia en

nuestro laboratorio indica que si no se tienen tales precauciones, se pueden crear artefactos que desemboquen en una mala interpretación de los datos [39].

(B) La segunda hipótesis de Evtodienko y cols. [40] es que la glucosa altera la homeostasis del Ca^{2+} . Cuando la glucosa o la desoxiglucosa entran a la vía glucolítica, rápidamente son fosforiladas por una hexocinasa. El efecto de esta fosforilación es el incremento en la concentración de H^+ en el citoplasma. Según Evtodienko, la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico se realizaría gracias a la entrada de H^+ vía un cotransporte electroneutro [40]. En estas condiciones, la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico se acelera y consume mucho ATP para recapturar al Ca^{2+} . Sin embargo, no existe evidencia de tal cotransporte, aunque puede ser posible que el canal de salida del Ca^{2+} del retículo endoplásmico al citosol pudiera ser sensible al incremento en la concentración de H^+ ; es decir, que a pH ácido se incrementara la frecuencia de apertura del canal, por lo que el Ca^{2+} saldría con mayor rapidez.

El aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático provocado por la glucosa y medido con un indicador fluorescente llega hasta 300nM [37,38], concentración que, según los autores, es capaz de inhibir a la fosforilación oxidativa. Sin embargo, se ha reportado que en mitocondrias aisladas de hepatocito, la concentración a la que existe inhibición de la respiración es por arriba de $1\mu\text{M}$ [41]. Se ha observado que a esta concentración se inhibe la fosforilación oxidativa por varios mecanismos:

- i) La inhibición de la hidrólisis y síntesis de la ATP sintetasa, posiblemente porque se forma un complejo ATP-Ca^{2+} que compete con el complejo ATP-Mg^{2+} [42], sustrato de la ATP sintetasa.
- ii) El Ca^{2+} promueve la asociación de la subunidad inhibidora de la ATP sintetasa a la enzima debido a que existe más proteína inhibidora en la célula tumoral que en la célula normal [1], lo cual incrementa su sensibilidad al Ca^{2+} [43].
- iii) La baja actividad de la translocasa de adenin nucleótidos, debido a que su sustrato es el ATP libre y, en estas condiciones, se encuentra complejoado con el Ca^{2+} [44].

El Mg^{2+} también está involucrado en el efecto Crabtree, pues se ha observado que, en las células tumorales de Ehrlich, en presencia de glucosa, existe una salida masiva de Mg^{2+} intracelular, teniendo como consecuencia una disminución en la concentración de Mg^{2+} interna y, por tanto, una inhibición de la respiración, debido a que el Mg^{2+} es cofactor de varias reacciones mitocondriales [31].

1.6 EFECTO DEL GRADIENTE DE O_2 Y pH EN EL DESARROLLO DEL TUMOR.

Los tumores sólidos son hipóxicos, además de encontrarse limitados de nutrientes y en un ambiente altamente ácido (por la elevada glucólisis), lo que conlleva a que existan cambios en su microambiente [45]. Tanto la hipoxia como el pH se han identificado como factores involucrados en la resistencia a la radioterapia y a la acción de algunas drogas anticancerígenas. Al parecer, una alta sensibilidad a la radiación está asociada a un metabolismo de tipo oxidativo, mientras que la resistencia a la radiación está asociada a un metabolismo de tipo glucolítico. Görlach y Acker [45] encontraron que es posible cambiar la dependencia de la línea tumoral con respecto a una vía metabólica a otra, variando los gradientes de O_2 y pH de su entorno, y de esta manera cambiar su sensibilidad a la radioterapia. Para lo anterior, los autores utilizaron, como modelo experimental de pobre vascularización, dos líneas cancerígenas de colon humano (HT29 y U118MG), cultivadas en forma de esferoides multicelulares tridimensionales, que en contraste con las células cancerígenas cultivadas en monocapa, revelan mayor sensibilidad a la radiación y a la quimioterapia. Aunque el aporte nutricional de los esferoides proviene del medio de incubación, en este modelo experimental se genera un gradiente de O_2 , causado por el consumo de oxígeno, y un gradiente de pH, causado por el rompimiento de la glucosa a ácido láctico, provocando una acidosis intracelular vía la hidrólisis de ATP y la liberación del lactato y H^+ fuera de las células.

Estos autores [45] encontraron que a pesar de que se trata del mismo tipo de célula tumoral, presenta diferencias metabólicas muy específicas. En el caso de las HT29 se registra un gradiente de oxígeno radial con una presión parcial de 120 mmHg en la periferia y de 6 mmHg en el centro, con un ΔpO_2 de 107 mmHg, mientras que en la U118MG se registra un gradiente de O_2 de 47 mmHg en el centro y de 120 mmHg en la periferia, con un ΔpO_2 de 78 mmHg (Figura 4). Al evaluar el

gradiente de pH en estas mismas líneas celulares se encontró que en la HT29, la superficie es más básica (pH 7.29) que el centro (pH 7.07); mientras que en la U118MG se registra un pH más ácido (pH 6.93) en el centro del nódulo que en la periferia (pH 7.25).

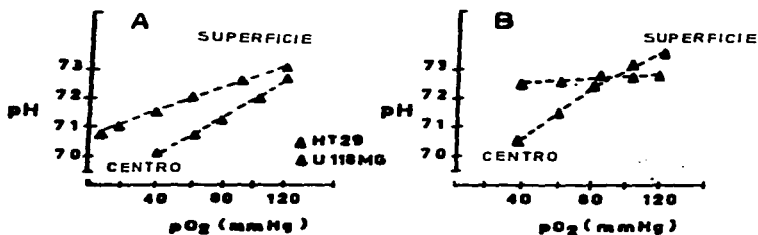


Figura 4. Relación entre los gradientes de O₂ y pH en los multiesferoides HT29 y U118MG en condición normal (A) y tratadas con oxamato 40mM (B). [Modificado de 45]

El incremento en acidez de la línea U118MG en el centro del nódulo, se explica por la evidente producción de ácido láctico, debida a la gran actividad de la lactato deshidrogenasa (800 U/ gramo de peso húmedo) y la baja oxidación del piruvato (60 nmol de piruvato oxidado/mg proteína).

Estas observaciones indican que la línea tumoral U118MG es metabólicamente más glucolítica, mientras que la HT29 es más oxidativa (ver panel A de la figura 4). Interesantemente, cuando se exponen ambas líneas tumorales al oxamato, la dependencia metabólica cambia. El oxamato es un análogo estructural del piruvato, que inhibe competitivamente a la lactato deshidrogenasa y al transporte de piruvato del citosol a la mitocondria. En presencia de oxamato, la actividad de la lactato deshidrogenasa disminuye drásticamente en las células U118MG (400 U/g peso húmedo), dejando que el piruvato sea consumido por otras vías para producir otros metabolitos de carácter oxidativo, sin que se produzca un cambio evidente en el gradiente de oxígeno pero sí en el gradiente de pH (ver panel B de la figura 4). Por el

contrario, en la HT29, que es predominantemente oxidativa, la presencia de oxamato provoca una inhibición en la oxidación de piruvato (de 100 nmol a 50 nmol de piruvato oxidado/mg. prot.), lo que hace que las células dependan más de la vía glucolítica que de la fosforilación oxidativa.

Estas investigaciones pueden tener implicaciones clínicas, debido a que estudios radiobiológicos sugieren que el O_2 influye en la radiosensibilidad, de tal manera que si se logra manipular a las células glucolíticas para volverlas oxidativas, los efectos de la radiación y quimioterapia serán más fuertes en células tumorales que previamente eran resistentes.

1.7 CONTROL DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN CÉLULAS Y MITOCONDRIAS AISLADAS DE AS-30D.

El análisis del control de la fosforilación oxidativa [46] en mitocondrias de hígado y en otros tipos mitocondriales no tumorigenos ha revelado que el control de esta vía se encuentra distribuido entre varios pasos. Los principales puntos de control son el acarreador de ATP/ADP, la citocromo oxidasa, el acarreador de dicarboxilatos, la ATP sintetasa y el complejo b-c₁, los cuales presentan coeficientes de control (Ci) [47] en el intervalo de 0.2-0.5, es decir, cada uno de estos pasos controlan la vía desde un 20 hasta un 50%, dependiendo de las condiciones particulares de incubación.

López Gómez y cols. [48] encontraron que en mitocondrias aisladas de AS-30D, el control de la fosforilación oxidativa recae principalmente en 2 enzimas importantes: el acarreador de ATP/ADP (Ci=0.7) y la ATP sintetasa (Ci=0.25), utilizando varios sustratos oxidables como glutamato-malato, piruvato-malato ó succinato-rotenona. Estos autores proponen que el alto coeficiente de control calculado para el acarreador de ATP/ADP indica que es un paso de severa limitación en el flujo total de la vía. La limitación del flujo por este paso puede deberse a la inhibición de la translocasa de adenín nucleótidos por los altos niveles de Ca^{2+} endógeno encontrados en mitocondrias tumorales [49].

En este trabajo se pretende obtener los Ci de mitocondrias "in situ" para compararlos con los obtenidos por López-Gómez [48] para las mitocondrias aisladas de la misma línea tumoral, y dilucidar si el control de la vía de flujo de fosforilación oxidativa es el mismo en mitocondrias que se encuentran inmersas en un

microambiente fisiológico, con determinados sustratos oxidables, que en las mitocondrias aisladas y con un ambiente artificial.

Cabe mencionar que el cálculo de los C_i se puede realizar utilizando diferentes ecuaciones. López-Gómez y cols. [48] consideraron que los inhibidores de la fosforilación oxidativa eran del tipo irreversible; es decir, una vez formado el complejo enzima-inhibidor no había manera de disociarlos. De esta manera, el valor de los C_i se calcula de la ecuación propuesta por Groen y cols. [47] para inhibidores irreversibles:

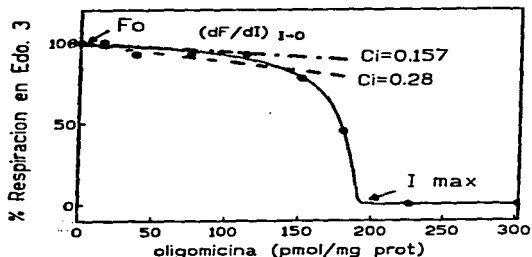
$$C_i = \frac{-Imáx \times \left[\frac{(dF)}{(dI)} \right]_{I=0}}{F_0}$$

donde $Imáx$ es la concentración mínima requerida de inhibidor para alcanzar la inhibición máxima, F_0 es el flujo de la vía en el sistema no inhibido, y dF/dI es el cambio en la velocidad de flujo a medida que se modifica la concentración de inhibidor cuando I tiende a cero (la pendiente). El cálculo de los C_i a partir de esta ecuación se basa sólo en los puntos iniciales de la curva, donde es posible extrapolar al punto donde no hay inhibición (Figura 5). Debe hacerse notar que este análisis depende de la inspección de tales puntos experimentales, para realizar una regresión lineal con la cual se obtiene una pendiente con un número reducido de puntos (comportamiento lineal) a concentraciones bajas de inhibidor ($I=0$). En otras palabras, en el cálculo de los C_i no existe un criterio para determinar cuales puntos de la curva deben ser considerados.

Actualmente se sabe que la mayoría de los inhibidores de la fosforilación oxidativa se enlazan de una manera pseudo-irreversible a sus respectivas enzimas, es decir, es posible encontrar un equilibrio entre la enzima y el inhibidor (el inhibidor permanece sólo fuertemente pegado a la enzima, pero es capaz de disociarse [50]).

Por tanto, Gellerich y cols. [51] propusieron un sistema de ecuaciones en donde se toma en cuenta la K_d , o constante de disociación del complejo enzima-inhibidor, para una inhibición de tipo pseudo-irreversible o "fuertemente pegado":

Mitocondrias de Hepatoma AS-30D



a) Inhibición irreversible:

$$C_i = (-I_{max}/F) (\delta F/\delta I)$$

$$C_i = 0.157 \text{ (---)}$$

$$C_i = 0.28 \text{ (-----)}$$

b) inhibición pseudo-irreversible:

$$C_i = \frac{n(J_0 - J_i)E^2 x E^n}{C_i x J_0 x E_0^n + ((n - C_i) x J_0 - (n x J_i)) x E^n} + J_i$$

$$E^2 + (K_d + I - E_0) x E - K_d x E_0 = 0$$

$$C_i = 0.058$$

$$E_0 = 227.5 \text{ pmol/mg prot}$$

$$K_d = 0.007 \text{ pmol/mg prot}$$

Figura 5. Representación gráfica de la estimación de los coeficientes de control de flujo utilizando la inhibición irreversible (línea punteada) o la inhibición pseudo-irreversible (línea sólida). La línea sólida es la mejor aproximación, utilizando la ecuación de Gellerich y cols. [47], de los puntos experimentales. La línea punteada representa los valores de C_i utilizando los cinco primeros puntos (---) ó los seis primeros puntos de la curva (-----).

$$J = \left[\frac{n(J_0 - J_i)^2 x E^n}{C_i x J_0 x E_0^n + [(n - C_i) x J_0 - n x J_i] x E^n} \right] + J_i$$

$$E + (K_d + I - E_0)x E - K_d x E_0 = 0,$$

donde J_0 y J_i se refieren a la velocidad del flujo en el sistema no inhibido ($E=E_0$) y completamente inhibido ($E=0$), K_d es la constante de disociación del complejo enzima-I, y n es un exponente empírico que establece la relación entre la concentración de sustrato y la reacción catalizada por la enzima (cuando $n=1$ la reacción es una función lineal de la concentración de sustrato).

Analizando los C_i obtenidos a partir de curvas de titulación en mitocondrias aisladas de hepatoma y utilizando la ecuación para inhibidores irreversibles, se encontró que el valor del C_i de la ATP sintetasa es aproximadamente de 0.3, muy similar al encontrado por López-Gómez y cols. [48]. Sin embargo, cuando el análisis de los mismos datos experimentales fueron hechos utilizando la ecuación para inhibidores pseudo-irreversibles, el valor del C_i fue aproximadamente de 0.1, un valor mucho más cercano al obtenido en células intactas (ver Figura 5).

Lo anterior nos hace pensar que la determinación de los C_i utilizando la ecuación para inhibidores irreversibles requiere (a) la inspección de los puntos iniciales de la curva de titulación para obtener una pendiente ($\delta F/\delta I$) tomando en cuenta el punto de flujo no inhibido (i.e, el estado de control donde se desea evaluar los C_i y (b) la decisión de saber cuantos puntos incluir en tal análisis de regresión. Lo anterior puede ilustrarse en la Figura 5, en donde se pueden calcular dos pendientes dependiendo del número de puntos experimentales considerados. En contraste, al utilizar la ecuación para los inhibidores pseudo-irreversibles, que involucra un análisis de tipo no lineal, se toman en cuenta todos los puntos de la gráfica (línea sólida en la Fig.5). En consecuencia, este último análisis es más confiable.

Algunos autores han sugerido que el sistema de fosforilación oxidativa en las mitocondrias aisladas del hepatoma de Morris, se encuentra afectado a nivel de la citocromo oxidasa y de la succinato deshidrogenasa. Además, la actividad de los citocromos a,b, c y c_1 está muy disminuída y, por tanto, actúan de manera deficiente,

en comparación con las mitocondrias de las células hepáticas normales [1]. Sin embargo, se requiere ampliar estas observaciones a otras líneas tumorales.

Otro factor involucrado en la dependencia de la célula tumoral a las vías productoras de energía en el citosol, además de la baja actividad de los citocromos, es la disminución en la cantidad de mitocondrias [1]. Sin embargo, esta situación nuevamente depende del tipo de línea tumoral, ya que en el hepatoma de Morris 16 y el hepatoma de Novikoff, la cantidad de mitocondrias es de sólo un 20 y un 40% en comparación con las células normales [52,53]; mientras que en el de Morris 7800, Ehrlich y posiblemente A5-SOD, el contenido es igual que el normal [1,54]. Además, la actividad de algunas deshidrogenasas mitocondriales de las células tumorales es alta [3, 24]. Por tanto, la suposición de que la cantidad de mitocondrias y/o la deficiencia de actividad en algunas enzimas son causantes de la baja actividad de la vía de fosforilación oxidativa no está sustentada para varias líneas tumorales.

Considerando lo anterior, y sabiendo que las células tumorales de rápido crecimiento son esencialmente glucolíticas, nuestra hipótesis de trabajo es que las células tumorales también dependen de la fosforilación oxidativa durante la proliferación celular. Para examinar esta propuesta, se requiere determinar la participación relativa de la fosforilación oxidativa al aporte celular de energía e identificar la enzima que limita el flujo de la fosforilación oxidativa, con lo que se podrá proponer una relación entre la velocidad de flujo del sistema y el metabolito preferencialmente más consumido.

2. Objetivos.

2.1 Objetivo General

Determinar el control de la fosforilación oxidativa en células de hepatoma AS-SOD.

2.2 Objetivos Particulares.

- 2.2.1** Determinar los principales metabolitos que preferentemente oxidan las células de hepatoma AS-SOD.
- 2.2.2** Cuantificar el grado de control de la vía de fosforilación oxidativa en presencia de los principales metabolitos oxidables, para encontrar una correlación entre la enzima reguladora y la posible vía metabólica que pueda estar activa en dichas células.
- 2.2.3** Determinar la concentración intracelular de cationes libres importantes en la modulación de la fosforilación oxidativa y la glucólisis, tales como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} .

CAPITULO II

Material y Métodos.

1.1 Conservación y propagación de la línea Tumoral AS-SOD.

La línea tumoral AS-SOD, empleada para el presente estudio, pertenece al tipo de "células tumorales de rápido crecimiento"; fue donada por el Dr. A. García-Sáinz, del Instituto de Fisiología Celular, y La Dra. M.E. Torres-Márquez, del Depto de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

Esta línea tumoral tiene la particularidad de poderse desarrollar en el líquido ascítico del abdomen de la rata. Gracias a ello, las células obtienen todo su aporte nutricional directamente de la rata.

1.2 Aislamiento de las Células Tumorales AS-SOD.

Las células tumorales fueron propagadas en ratas cepa Wistar, de 200-300 g de peso, como se describió previamente en [48], con las modificaciones realizadas en este laboratorio (Apéndice A).

La densidad celular y la viabilidad se determinó con el uso de una cámara de Neubauer y por el método de exclusión con azul tripano al 0.1% [55].

1.3 Medición de la cantidad de proteína celular

La proteína fue cuantificada utilizando el método de Biuret [56], utilizando un estandar de albúmina sérica bovina, desoxicolato de sodio al 1% (p/v) y 10 µl de las células tumorales previamente lavadas y diluidas 1:100.

1.4 Medición de los diferentes metabolitos intracelulares.

La determinación de los diferentes metabolitos intracelulares se realizó utilizando métodos enzimáticos estandar, pero con modificaciones hechas en este laboratorio. Para llevar a cabo este análisis, las muestras fueron incubadas a 37°C en un baño de agitación orbital, durante 25 y 40 minutos. Posteriormente, las células y el

líquido de ascitis fueron precipitados en 3% de ácido perclórico y neutralizados con una mezcla de KOH 3N/Tris 50mM. Los metabolitos evaluados fueron los siguientes:

<i>Metabolito</i>		
a)	glucosa	(gluc)
b)	piruvato	(pir)
c)	lactato	(lac)
d)	glutamato	(glu)
e)	glutamina	(gln)
f)	β -hidroxibutirato	(β -OHbut)
g)	Acetoacetato	(AcAc)
h)	glucógeno	(glucog)
i)	ATP	(ATP)

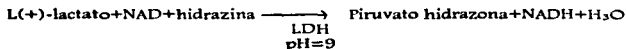
1.4.1. Determinación de glucosa en los extractos neutralizados de células y en el líquido de ascitis, por el método de la glucosa oxidasa.

La determinación de la glucosa por el método de la glucosa oxidasa [57] se realizó polarográficamente, utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark. Todas las mediciones se realizaron a 30°C, en 0.4 ml de amortiguador de fosfato 0.1 M (pH 7.2) y 1.5 ml de muestra neutralizada. La reacción se inició por la adición de aprox. 12 U/mg de glucosa oxidasa (marca Merck). Los valores obtenidos se interpolaron a una curva conocida de glucosa, en un intervalo de 100-500 nmoles. Los valores obtenidos fueron corregidos utilizando los factores de dilución de cada muestra.

1.4.2. Determinación de lactato y de piruvato en extractos neutralizados de células y líquido de ascitis, por el método de la lactato deshidrogenasa.

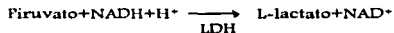
La determinación de estos metabolitos se realizó espectrofotométricamente, a 340nm, en un espectro de doble haz, marca AMINCO-BOWMAN 2000, siguiendo la reacción:

a) Lactato [59].



Todas las mediciones se realizaron a 30°C, en un volumen final de 2.92 ml, que contenía: 2.5 ml de amortiguador de hidrazina 0.4 M-Glicina 0.5 M, pH 9; 0.2 ml de NAD 40 mM y 0.2 ml de extracto neutralizado de células ó líquido de ascitis. La reacción se inició por la adición de 19 U/ml de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo de conejo. La cantidad de lactato se determinó por el cambio de absorbancia del NADH, medido a 340 nm. Los valores obtenidos se corrigieron por los factores de dilución de cada muestra.

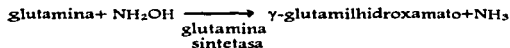
b) Piruvato [58]:



Todas las mediciones se realizaron a 30°C, en un volumen final de 1 ml, que contenía 0.25 ml de amortiguador de trietanolamina (TEA) 0.5 M - EDTA 5 mM, pH 7.6 con NaOH; 0.02 ml de NADH 7 mM y 0.5 ml de muestra neutralizada. La reacción se inició por la adición de 19 U/ml de la enzima LDH. Los valores obtenidos fueron corregidos por los factores de dilución de cada muestra.

1.4.3 Determinación de glutamato y de glutamina en extractos neutralizados de células y líquido de ascitis de la línea AS-30D.

a) La determinación de glutamina [61] en extractos se realizó colorimétricamente, midiendo el cambio en la absorbencia a 500 nm, siguiendo la reacción:



El γ -glutamilhidroxamato que se forma en la reacción da un complejo colorido en presencia de las sales de hierro (Fe^{3+}), que se registra a 500 nm.

Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente en un volumen final de 2 ml que contuvo 0.7 ml de la mezcla de ensayo (Tris 0.2 M, NH_2OH 0.1 M, Na_2HAsO_4 10 mM, MnSO_4 0.5 mM, ADF 1.5 mM) y 1.2 ml del extracto neutralizado.

La reacción se inició por la adición de 1 U/ml de la enzima glutamina sintetasa. Una vez iniciada la reacción, se mezcló vigorosamente y se incubó 30 minutos a 37°C. Al finalizar el tiempo, se adicionaron 2 ml de cloruro férrico/TCA siguiendo las especificaciones de [52]. Los valores obtenidos fueron interpolados a una curva estandar de glutamina, en un intervalo de 0.5-1 $\mu\text{mol/ml}$ y corregidos por los factores de dilución.

b) La determinación de glutamato [60] en extractos neutralizados se realizó colorimétricamente, en un espectrofotómetro, a 339 nm. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, en un volumen final de 2 ml, que contenía: 1 ml de amortiguador Tris 0.1 M/ hidrazina 0.63 M/EDTA 2 mM; 100 μl de NAD 30 mM; 10 μl de ADP 100 mM; 500 μl de muestra neutralizada y 390 μl de agua bidestilada. La reacción se inició por la adición de la enzima glutamato deshidrogenasa (12 U/ml). Los valores obtenidos fueron interpolados a una curva estandar de glutamato en un intervalo de 0.1-0.5 $\mu\text{mol/ml}$ y corregidos por los factores de dilución.

1.4.4. Determinación del AcAc y el β -OHbut en muestras neutralizadas de células y líquido de acitis de la línea tumoral AS-SOD, por el método de la fenazina metosulfato.

a) La determinación del β OHbut [62] se realizó siguiendo las reacciones:



*BPS: ácido disulfónico de batofenantrolina

El NADH generado por la β OHbut DH en la reacción 1 reduce al Fe^{3+} en Fe^{2+} , utilizando la fenazina metosulfato como mediador redox en la segunda reacción. Lo anterior da como resultado un incremento en la absorbencia del complejo BPS-Fe^{2+} , medido a 546 nm, en un espectrofotómetro.

Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente en un volumen final de 0.8 ml de la mezcla de reacción, que contenía: NAD 2.5 mM/Pi 95 mM, Fe^{3+} ($FeCl_3$) 0.5 mM/ BPS 2 mM, 0.6 ml de extracto neutralizado y fenazina metosulfato 3 μ M. La reacción se inició con 710 mU/ml de la enzima β OHbut DH.

Una vez agregada la enzima, se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los datos obtenidos fueron interpolados a una curva estándar de β OHbut en un intervalo de 0.5 nmoles a 10 μ moles. Los valores obtenidos fueron corregidos por los factores de dilución.

b) La determinación del AcAc se realizó a temperatura ambiente, en un espectrofotómetro, siguiendo la reacción colorimétrica:



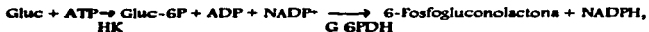
El AcAc es reducido a β OHbut por la enzima β OHbut DH, el cual puede ser detectado por el método de la fenazina metosulfato.

Todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente en un volumen final de 1 ml de la mezcla de reacción que contuvo TEA 53 mM/EDTA 1.3 mM/ NADH 2 mM, 0.7 ml de extracto neutralizado y 530 mU/ml de enzima β OHbut DH.

Se analizaron paralelamente dos muestras (1 y 2), las cuales se agitaron vigorosamente y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo, se detuvo la reacción de una de ellas (1), agregando 50 μ l de ácido perclórico al 70% (w/w); la muestra acidificada se neutralizó con bicarbonato de potasio y se centrifugó en una centrifuga clínica. Se recuperó el sobrenadante, el cual se calentó durante 15 minutos a 56°C y se determinó β -OHbut por el método de la fenazina metosulfato. Los valores obtenidos fueron restados a la muestra (2) para obtener los valores reales de AcA, lo cuales se corrigieron con los factores de dilución respectivos de cada muestra.

1.4.5. Determinación de ATP en los extractos neutralizados de las células y el líquido de acitis de la línea tumoral AS-SOD.

La determinación de ATP [64] se realizó enzimáticamente siguiendo la reacción a 340 nm:



Abreviaturas: HK, hexocinasas; G6PDH, glucosa-6 fosfato deshidrogenasa.

utilizando un espectrofotómetro de doble haz.

Todas las determinaciones se realizaron a 30°C, en un volumen final de 2.5 ml que contenía: HEPES 0.1 M, glucosa 8 mM, NADP 0.16 mM, G6PDH 8 U/ml y 0.5 ml de la muestra. La reacción se inició con 9 U/ml de la HK.

Los valores obtenidos fueron corregidos con los factores de dilución correspondientes a cada muestra.

1.4.6. Determinación colorimétrica del glucógeno en extractos neutralizados de las células de la línea tumoral AS-30D.

La determinación del glucógeno [63] en las células AS-30D se realizó a partir de 15×10^6 células totales, las cuales fueron sonicadas en tres ciclos de 20 seg. con intervalos de 10 seg., en un sonicador marca Branson-Sonifier 450.

Para verificar la viabilidad de las células se utilizó el método de la tinción con azul tripano al 0.1%, el cual reveló de un 90 a un 100% de mortandad.

Una vez sonicada, la muestra se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga Sorvall. El botón se resuspendió en 3 ml de SDS al 1.0% y se hirvió durante 5 minutos en baño maría. La muestra hervida se centrifugó nuevamente a 15000 rpm durante 15 minutos. El botón se resuspendió en 3 ml de SDS al 0.1%. La muestra se recentrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. El botón recuperado se suspendió en aprox. 400 µl de NaOH 10.1 N.

Una vez obtenida la muestra, se mezcló con 600 µl de fenol al 5% y 3.6 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Las muestras coloridas se leyeron en un espectrofotómetro, a 486 nm, y los valores se interpolaron a una curva estandar de glucosa, en un intervalo de 20 a 100 µg/ml de glucosa.

1.5 Determinación del volumen intracelular en células de hepatoma AS-SOD, utilizando el método radiactivo con $^3\text{H}_2\text{O}$ e $[^3\text{H}]$ -Inulina.

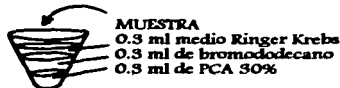
La determinación del volumen intracelular en células de hepatoma se realizó utilizando la técnica propuesta por Rottenberg [65], que se basa en la separación de las células utilizando como filtro un solvente orgánico (bromododecano).

La muestra celular se incuba por separado con dos compuestos radiactivos: $[^3\text{H}]$ -Inulina (volumen externo) y $^3\text{H}_2\text{O}$ (volumen interno). La actividad específica del $^3\text{H}_2\text{O}$ y de la $[^3\text{H}]$ -Inulina fue calculada en 13,300 cpm/ μl de $^3\text{H}_2\text{O}$ y 6.6×10^5 cpm/mg de $[^3\text{H}]$ -Inulina. El volumen final se calcula utilizando la siguiente ecuación [65]:

$$\left(\frac{{}^3\text{pastilla} \quad {}^3\text{Inulina pastilla}}{{}^3\text{H SN} \quad {}^3\text{Inulina SN}} \right) = \text{Volumen intracelular}$$

A) Preparación de los tubos:

En tubos *ependorf* de 1.5 ml se colocan las soluciones en el siguiente orden:



B) Incubación

1. En el tubo de reacción se colocaron 0.5 ml de las células (1×10^8 células./ml), se adicionaron 15 μl de $^3\text{H}_2\text{O}$ y se incubó a 37°C por un minuto. Se tomó la muestra y se colocó en el *ependorf* preparado, sobre la fase del medio Ringer. Se centrifugó durante 4 minutos a 14,000 rpm en una microfuga. Posteriormente, se tomaron 200 μl del SN (sobrenadante) de la 1ra. y tercera fase, y se colocaron en un vial para cuantificar la radiactividad.
2. En otro tubo de reacción se colocaron 0.5 ml de las células del mismo stock que en el punto anterior y se incubaron a 37°C durante 45 segundos. Al finalizar el tiempo, se agregaron 15 μl $[^3\text{H}]$ -Inulina. Se realizó el mismo procedimiento de separación de sobrenadantes, pipeteando los mismos volúmenes. Las dos muestras

(SN de la 1er fase y SN de la Ser. fase) se colocaron en viales para cuantificar la radiactividad.

Una vez terminado el experimento, a las muestras se les adicionaron 5 ml de líquido de centelleo y se contaron en un contador de centelleo marca Packard-Tricarb 2100TR.

1.6 Determinación de la concentración de oxígeno en el líquido del hepatoma AS-SOD.

Esta determinación se realizó utilizando un electrodo de oxígeno y un oxímetro YSI. Alicuotas del hepatoma recién extraído de una rata viva fueron adicionadas a un medio Ringer-Krebs previamente titulado con ditionita, para obtener una concentración limitante de oxígeno en la cámara (20-30%).

Las alicuotas del líquido del hepatoma (200 μ l) fueron extraídas con una jeringa insulínica previamente llenada con ácido perclórico (PCA) al 30% (100 μ l). Las jeringas se agitaron suavemente y se inyectó la mezcla (100 μ l) a la cámara de oxígeno con la [O₂] limitante.

La solubilidad del O₂ a 30°C en el medio de Ringer-Krebs se calculó en 760 ngAO/1.9 ml de medio. Los cálculos se realizaron tomando en cuenta que 2 ngAO corresponden a 1 nmol de O₂ disuelto en el medio.

1.7 Medición de la respiración celular absoluta.

La medición de la respiración celular absoluta (Apéndice B) se realizó mediante el método polarográfico, utilizando un oxímetro y un electrodo de oxígeno tipo Clark, ambos marca YSI.

Todas las mediciones se realizaron a 37°C, en 1.9 ml del medio Ringer-Krebs modificado y saturado con aire. La descripción completa del medio se encuentra en el Apéndice A.

1.8 Evaluación cuantitativa de los Ci, utilizando la aproximación de Gellerich y cols. [51].

La medición de los Ci se realizó mediante el método de inhibición específica propuesta por Westerhoff y Tager [66], en el cual se fue inhibiendo (titulando) a cada enzima de la vía de la fosforilación oxidativa con un inhibidor específico de cada enzima y registrando el cambio en la respiración celular absoluta.

Los inhibidores específicos utilizados fueron los siguientes:

INHIBIDOR	Sitio de Inhibición	Ki pmol/mg prot mitocondrial	Concentración utilizada (pmol/10 ⁷ células)	Disolvente
Rotenona (Rot)	NADH-ubiquinona oxido - reductasa (Sitio I)	≈3-4 [67]	1.5-500	DMSO ¹
Antimicina (Antim)	Citocromo <i>b₅₅₈</i> de alto potencial (Sitio II)	≈0.2-0.3 [67]	1-100	DMSO
Mixotiazol (Mixo)	Citocromo <i>b₅₅₈</i> de bajo potencial (Sitio II)	-	1.5-250	DMSO
Cianuro (KCN)	Citocromo Oxidasa	≈3-5 μM [67]	0.2-20mM	Agua
Azida de sodio (Azida)	Citocromo Oxidasa	≈20-60μM[67]	1-60mM	Agua
Oligomicina (Oligo)	Forción F ₀ de la ATP - sintetasa	≈0.3-1 [67]	5-500	DMSO
Venturicidina (Vent)	Forción F ₀ de la ATP- sintetasa	--	10-700	DMSO

DMSO¹. Dimetil sulfóxido

Se comenzó a titular con concentraciones del inhibidor que corresponden aproximadamente al 1% de la concentración máxima utilizada. El inhibidor se adicionó a los 10 segundos después de que fueron agregadas las células tumorales.

Cabe mencionar que los inhibidores utilizados en este trabajo son pseudo-irreversibles, del tipo "fuertemente pegados" ó también llamados "tightly-bound" [50], excepto el KCN, que es un inhibidor de tipo no competitivo clásico. En los inhibidores fuertemente pegados existe una fuerte interacción entre el inhibidor y la enzima, sin llegar a la irreversibilidad. Por tanto, los datos obtenidos de cada curva de titulación fueron introducidos a la ecuación propuesta por Gellerich y cols. [51] para inhibidores fuertemente pegados no competitivos, que involucra la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor (K_d) y la cantidad de enzima total (E_0). (La ecuación de Gellerich se muestra en la sección 1.7 de la Introducción).

Para calcular los C_i a partir de estas ecuaciones se requiere de un análisis de regresión no lineal, que puede determinarse mediante un programa de cómputo, como el Graphpad Inplot4, el cual permite que los valores de los parámetros sean iterados hasta llegar a un ajuste confiable.

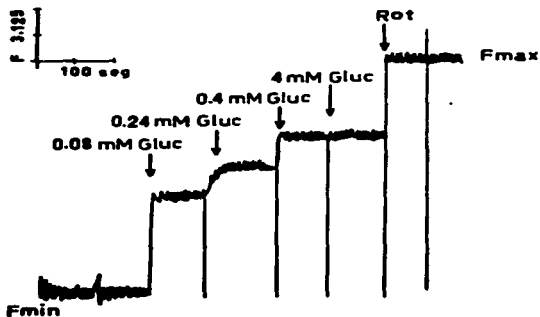
1.9 Determinación del efecto Crabtree en las células tumorales de AS-30D.

Las células previamente lavadas fueron incubadas (10^7 células/ml) en 1.9 ml de medio Ringer-Krebs saturado con aire, a 37°C. La respiración celular fue determinada por el método polarográfico, con un electrodo de O_2 y un oxímetro YSI. Concentraciones conocidas de glucosa y fructosa fueron añadidas al medio en un intervalo de 0.5-10mM y de 0.5-20mM, respectivamente.

1.10 Medición de la reducción de piridin nucleótidos citosólicos en el hepatoma AS-30D, en presencia de concentraciones conocidas de glucosa.

Todas las determinaciones se realizaron a 37°C, en un fluorómetro marca AMINCO-Bowman 2000, a una longitud de onda de excitación de 340 nm y una de emisión de 460 nm. El experimento anterior se realizó en ausencia y presencia de oligomicina 12.5 μ M.

La calibración de la señal de la fluorescencia de los piridín nucleótidos en las células tumorales AS-30D se muestra a continuación:



Las células (10^7 células/ml) fueron incubadas en un medio Ringer-Krebs modificado, a 37°C , en un medio saturado con aire, durante algunos minutos, hasta alcanzar la línea basal (fluorescencia mínima). Posteriormente, se adicionaron concentraciones conocidas de glucosa (de 0.08 a 4 mM), observándose un incremento en la fluorescencia. La fluorescencia máxima se obtuvo por la adición de una concentración saturante de rotenona ($20\mu\text{M}$).

Abreviaturas: Gluc, glucosa; rot, rotenona.

1.11 Determinación de la concentración de Ca^{2+} libre citosólica en las células de hepatoma AS-30D, utilizando el indicador Indo-1AM [39].

Las células del hepatoma (100×10^6 células./ml) fueron incubadas con $3\mu\text{M}$ de Indo-1AM durante 40 minutos, a 30°C , con agitación orbital (150 rpm), en 3 ml de

medio Ringer-Krebs, suplementado con EGTA 1.3 mM y albúmina libre de ácidos grasos al 2%. Al finalizar el tiempo, las células fueron lavadas y resuspendidas en medio Ringer-Krebs, suplementado con EGTA 1 mM y albúmina al 0.2%. Se centrifugó la muestra a 2000 rpm, recuperándose el botón celular que fue colocado a 4°C hasta su uso.

Para la fase experimental, se incubaron alícuotas de las células cargadas con el indicador en 2.5 ml de medio Ringer-Krebs, a 30°C, a una concentración de 5×10^6 células. totales. La fluorescencia fue medida en un fluorómetro Aminco-Bowman 2000; la longitud de onda de excitación fue de 350 nm y las de emisión fueron de 395 y 485nm.

El contenido de Ca^{2+} libre citosólico se cuantificó en las células del hepatoma AS-30D cargadas con Indo-1AM, utilizando el cociente 395/485 (R) y la siguiente expresión matemática [39]:

$$[Ca^{2+}] = \frac{Kd(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \cdot \frac{Sf_2}{Sb_2},$$

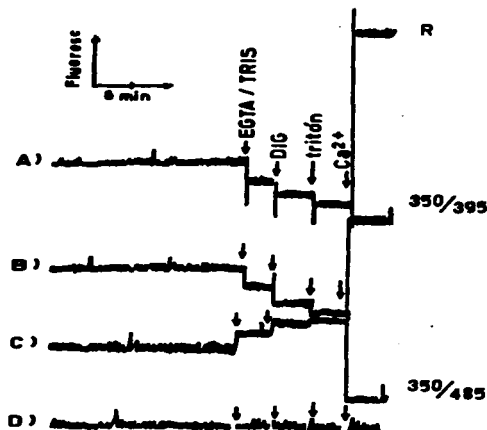
donde R_{min} y R_{max} son los cocientes de fluorescencia obtenidos en ausencia y presencia de Ca^{2+} saturante, respectivamente, Sf_2 y Sb_2 son las señales de fluorescencia a 485 nm en ausencia y presencia de Ca^{2+} saturante. Kd es la constante de disociación del complejo indicador- Ca^{2+} y tiene un valor de 179 nM a 37°C y pH de 7.2 [68].

El procedimiento de calibración de la señal de fluorescencia se muestra a continuación

Para calibrar una señal de fluorescencia, se requiere de la generación de una fluorescencia máxima (R_{max}) y una mínima (R_{min}), de preferencia para cada experimento individual, como se muestra en la siguiente figura. Para obtener la R_{min} , se permeabilizó la membrana plasmática con 60 pmol de digitonina por 10^7 células., seguido de 0.02 %de tritón X-100, en presencia de una concentración saturante de EGTA/tris (5 mM). Para obtener la R_{max} , se agregó una concentración saturante de Ca^{2+} (10 mM) (A).

El Indo-1AM tiene como ventaja que sus propiedades fluorescentes permiten medir los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ a 2 diferentes longitudes de onda de excitación. Esta

característica elimina posibles cambios artefactuales en la señal de la fluorescencia, producidos por cambios en la viscosidad, la fuerza iónica, la pérdida del indicador ó las fluctuaciones en el indicador [39]. Sin importar la naturaleza de estos cambios inespecíficos, la señal fluorescente se afectará a las dos longitudes de onda en la misma dirección, ya sea apagamiento ó aumento de la fluorescencia (B y C). Las diferentes adiciones ensayadas en (A) no afectan la fluorescencia intrínseca de las células (D). Las flechas en cada trazo muestran las mismas adiciones que (A).



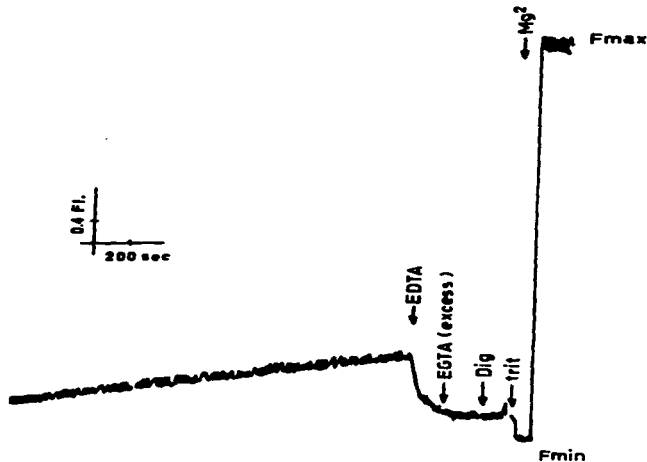
1.12 Determinación de la concentración de Mg^{2+} libre citosólica en las células del hepatoma AS-SOD

Las células del hepatoma (100×10^6 células/ml) fueron procesadas de igual manera que en el punto anterior, con la excepción de que fueron cargadas con el indicador Mag-Fura 2 (Furapra), selectivo para el magnesio [69,70].

La concentración utilizada de Mag-Fura 2 fue de $3 \mu M$, y el tiempo de incubación fue de 30 minutos, a $30^\circ C$, en agitación orbital constante.

Para la fase experimental se incubaron alícuotas de las células cargadas con el indicador, en 2.5 ml de medio Ringer-Krebs, a $30^\circ C$, a una concentración de 5×10^6 células totales. La fluorescencia fue medida en un fluorómetro SLM-Aminco; las longitudes de onda de excitación fueron de 342 y 385 nm y la de emisión fue de 495 nm.

El procedimiento de calibración de la señal de fluorescencia se muestra a continuación:



Para calibrar una señal de fluorescencia se requiere de la generación de una fluorescencia máxima (F_{max}) y una mínima (F_{min}), de preferencia para cada experimento individual, como se muestra en la siguiente figura. La F_{min} se obtuvo al permeabilizar la membrana plasmática con 60 μmol de digitonina por 10^6 células, seguido de 0.02 % de triton X-100, en presencia de una concentración saturante de 5 mM EDTA/Tris y 10 mM EGTA/tris. Para obtener la F_{max} se agregó una concentración saturante de Mg^{2+} (70 mM).

La concentración de Mg^{2+} libre citosólico se cuantificó en las células de hepatoma AS-30D cargadas con Mag Fura-2, utilizando la siguiente expresión matemática [71]:

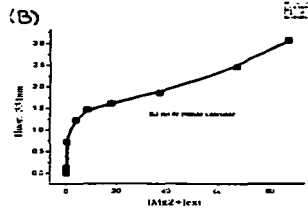
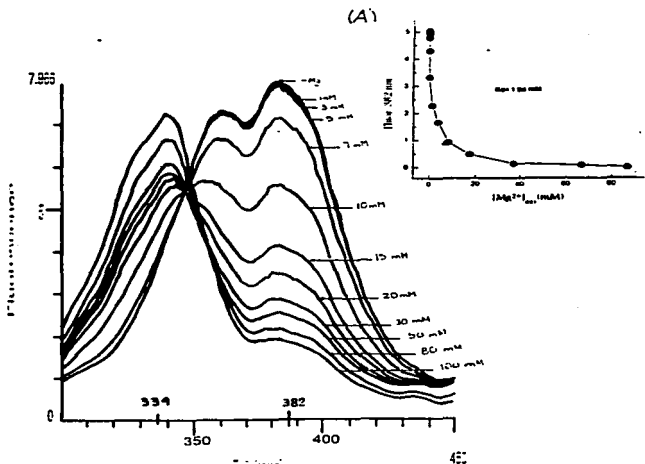
$$[\text{Mg}^{2+}] = K_d \frac{(F_{min} - F)}{(F - F_{max})}$$

donde F_{min} y F_{max} son las señales de fluorescencia obtenidas en ausencia y presencia de Mg^{2+} saturante, respectivamente. K_d es la constante de disociación del complejo indicador- Mg^{2+} , que se determinó en las condiciones experimentales utilizadas.

En este caso, no se pudo utilizar el cociente de fluorescencia (R) 385/495 debido a que no se logró una consistencia en los datos obtenidos en la región de 340 nm, debido a que probablemente el complejo Indicador- Mg^{2+} se está complejando con proteínas celulares. Por tanto, sólo fue tomada en cuenta la región de 380 nm, que corresponde a la región del indicador libre como se muestra a continuación:

Alicuotas de células AS-30D cargadas con 3 μM del indicador Mag-Fura 2 (5×10^6 células) fueron adicionadas a un medio Ringer-Krebs que contenía 60 μmol de digitonina/ 5×10^6 células para lograr una permeabilización del 88-95%. Se obtuvieron espectros de excitación de 300 a 450 nm con una emisión a 510 nm, en ausencia y en presencia de concentraciones conocidas de Mg^{2+} , en un intervalo de 1-100 mM, como se muestra en la siguiente figura.

Del espectro se obtuvo un gráfico a partir del cual se obtuvo la K_d (1.9 mM), considerando sólo la región a 382 nm, como se muestra en el recuadro (A). En la región a 334 nm no se logró calcular la K_d , debido a que no se observó una fluorescencia máxima constante (recuadro B), lo que demuestra que el complejo Mag Fura 2-Mg²⁺ se une a proteínas citoplasmáticas. Por tanto se tomó en cuenta la fluorescencia (F) a una sola longitud de onda y no a dos, como en el caso del Indo-AM.



CAPITULO III

Resultados.

Las células tumorales empleadas en este estudio fueron cosechadas al séptimo u octavo día después de su inoculación. Se realizó una curva de crecimiento (número de células/ml vs tiempo de inoculación), la cual reveló que al día séptimo u octavo las células se encontraban en fase proliferativa. Al día 11-12 existe muerte de la rata (n=3).

Para este estudio, se utilizaron células cuya viabilidad inicial osciló entre el 96 y el 99%, y el grado de contaminación con eritrocitos no excedió del 1%.

1.1 Variación en la concentración de los diferentes metabolitos evaluados en las células del hepatoma AS-30D.

En las Tablas 1 y 2 se muestran los metabolitos que se consumen, que se producen y los que no cambian durante la incubación de las células del hepatoma AS-30D a 37°C, en medio Ringer-Krebs. Como puede observarse, la glucosa se consume rápidamente, al igual que el glutamato, el AcAc, el β -OHbut y el glucógeno (Tabla 1). El consumo de la glucosa a los tres tiempos es significativamente diferente ($P < 0.05$), mientras que el glutamato, el AcAc, el β -OHbut y el glucógeno son significativamente diferentes ($P < 0.05$) cuando se compara t_0 vs t_{60} .

Por otro lado, el lactato se acumula con el tiempo (significativamente diferente $P < 0.05$ t_0 vs t_{60}), mientras que el ATP, el piruvato y la glutamina permanecen sin cambio durante los tiempos evaluados (Tabla 2). La concentración de los sustratos se calculó a partir de la determinación del volumen intracelular [65], como se describe en la sección 1.3 de Material y Métodos. De acuerdo con lo anterior, las células tumorales al tiempo basal (t_0) tienen un volumen de $2.5 \pm 0.13 \mu\text{l} / 10^7 \text{células}$. (n= 4), y a medida que se prolonga el tiempo de incubación, su volumen se reduce a 1.65 ± 0.09 (n=4) y a $1.4 \pm 0.3 \mu\text{l} / 10^7 \text{células}$. (n=4) a los 25 y 40 minutos de incubación, respectivamente. Así, aunque existe una disminución en la cantidad de sustrato (en nanomoles), la concentración permanece constante.

TABLA 1.

Metabolitos consumidos por las células de hepatoma AS-30D y contenido en líquido de Ascitis.

METABOLITOS	CELULAS AS-30D (nmol/10 ⁷ células) minutos de incubación a 37°C en Medio Ringer			LIQUIDO DE ASCITIS (mM)
	Basal(t ₀)	t ₂₅	t ₄₀	
Glucosa	3.2±1.2* [1.2±0.1] (7)	1.6±0.6* [0.99±0.4] (6)	1.1±0.6* [0.7±0.6] (6)	0.022±0.01 (5)
Acetoacetato	0.21±0.07* [0.1±0.04] (5)	0.09±0.04 [0.06±0.02] (4)	0.03±0.01* [0.04±0.03] (4)	0.87±0.6 (4)
β-OHbutirato	0.3±0.09* [0.1±0.005] (5)	0.2±0.03 [0.1±0.001] (4)	0.15±0.06* [0.1±0.003] (5)	0.04±0.01 (3)
Glutamato	24±3* [9.6±1.4] (4)	17±4 [11±3] (4)	11.5±3* [7.6±2.4] (4)	0.095±0.15 (4)
Glucógeno	µg/10 ⁷ células			
	2.3±0.7* (3)	1.3±0.4(3)	0.7±0.3*(3)	

Los valores representan la media± desviación estandar. El número de experimentos se muestra entre paréntesis.

Los datos entre corchetes cuadrados representan los valores en mM.

* significativamente diferentes entre sí (P<0.05)

Por ejemplo, en el caso del β -OHbut donde la cantidad de sustrato disminuye significativamente de 0.3 a 0.15 nmol/10⁷células, la concentración permanece sin cambio (0.1 mM); en el caso del piruvato, aunque la cantidad es igual en todos los tiempos, la concentración aumenta considerablemente (de 0.08 a 0.14 mM). Al parecer, en los demás sustratos se conserva la tendencia tanto en cantidad como en concentración.

Es importante comentar que después de cada incubación, la viabilidad disminuyó aproximadamente un 6% [del 98 \pm 0.01% (*t₀*) al 92 \pm 0.03% (*t₆₀*) (P<0.05)], sugiriendo que no hubo muerte celular evidente durante cada incubación.

Estos metabolitos también fueron cuantificados en el líquido de ascitis (fracción libre de células), encontrándose una concentración muy baja de glucosa y glutamato; mientras que la concentración de los otros metabolitos (lactato, glutamina, β -OHbut, AcAc, piruvato) se encuentran dentro del intervalo fisiológico reportado en suero de rata normal [72,73,74].

Para valorar los resultados obtenidos con células de hepatoma AS-30D, procedimos a determinar algunos metabolitos (lactato y glucosa) en otro tipo de tejido, el hígado de rata. La concentración de lactato y glucosa en rebanadas de hígado, incubadas en las mismas condiciones experimentales que las células tumorales, no varió después de 40 minutos de incubación, a 37°C, con agitación moderada: de 0.3-0.4 μ moles/g de peso húmedo (n=4) y de 7-10 μ moles/g peso húmedo (n=4), respectivamente. Estos datos indican que el hígado tiene una glucólisis menos activa que las células de hepatoma AS-30D. Cabe mencionar que la misma concentración de glucosa y láctico fue obtenida por otros autores en hígado perfundido [74, 74A].

La cantidad de oxígeno en el líquido de hepatoma también fue determinada, encontrándose una concentración relativamente alta de oxígeno (Tabla 2).

TABLA 2.

Concentración de metabolitos encontrados en células AS-30D y líquido de ascitis

METABOLITOS	CELULAS AS-30D (nmol/10 ⁷ células)			LIQUIDO DE ASCITIS (mM)
	Basal (T ₀)	minutos de incubación a 37°C en Medio Ringer		
		t ₂₅	t ₅₀	
Lactato	13±2* [5.2±0.8] (3)	25±10 [10.4±0.3] (3)	30±9* [12±3.5] (3)	3.3±0.3 (3)
Glutamina	0.32±0.1 [0.18±0.1] (5)	0.32±0.1 [0.2±0.09] (5)	0.24±0.1 [0.17±0.03] (5)	4 ±1.3 (4)
Piruvato	0.2±0.06 [0.08±0.02] (4)	0.2±0.05 [0.12±0.03] (5)	0.2±0.1 [0.14±0.07] (5)	0.16±0.04 (3)
ATP	1.1±0.3 [0.4±0.2] (3)	0.4±0.1 [0.2±0.07] (3)	1.0±0.05 [0.5±0.2] (3)	<0.001 (3)
[O ₂] disuelta				52.12±6μM (4)

Los valores representan la media± desviación estandar. El número de experimentos se muestra entre paréntesis.

Los datos entre corchetes cuadrados representan los valores en mM.

*significativamente diferente entre sí (P<0.05)

1.2 Determinación de la relación NADH/NAD⁺ citosólica y mitocondrial en células AS-SOD

Con los valores determinados para lactato, piruvato, β -OHbut y AcAc, fue posible calcular las relaciones NADH/NAD⁺ citosólicas y mitocondriales en las células AS-SOD (Tabla 3) [Apéndice C].

TABLA 3.

Relación NADH/ NAD⁺ encontrada en el citosol y en las mitocondrias de las células AS-SOD y de los hepatocitos, a través del tiempo

Relación NADH/NAD ⁺	Basal (t ₀)	t ₂₅	t ₄₀	Hepatocito
Citosólica	0.0071±0.003 (4)	0.014±0.002 (4)	0.016±0.009 (4)	0.0013 [74,75]
Mitocondrial	0.071±0.06 (4)	0.123±0.03 (4)	0.28±0.2 (4)	0.159 [76]

Los valores representan la media de 4 experimentos diferentes \pm desviación estandar.

Como se observa, la relación NADH/NAD⁺ tanto citosólica como mitocondrial va incrementándose a través del tiempo. Es evidente que, durante este estado estacionario, existe un incremento en la reducción del NAD⁺, debido al aumento en la actividad de las deshidrogenasas citosólicas y mitocondriales. Los datos anteriores fueron comparados con las relaciones NADH/NAD⁺ encontradas en hepatocitos y encontramos que mientras la relación NADH/NAD⁺ citosólica tumoral es mayor, el valor de la relación NADH/NAD⁺ mitocondrial tumoral es muy semejante a la encontrada en los hepatocitos [75].

1.3 Variación de los metabolitos intracelulares en las células incubadas en presencia de diferentes fuentes de carbono

Desde el punto de vista fisiológico, los experimentos anteriores (Tablas 1-3) podrían no ser válidos, debido a que durante el procesamiento, las células tumorales son extraídas del medio que las rodea (líquido ascítico). Por lo anterior, se determinaron algunos metabolitos celulares, en presencia de sustratos cuya concentración es importante en el líquido de ascitis (glutamina), y en presencia de aquellos cuya concentración en el tumor es muy baja, pero que en condiciones normales es importante (glucosa y glutamato). En la tabla 4 se observa la variación en la concentración de diferentes metabolitos en células incubadas al t_{40} en presencia de glutamina, glutamato o glucosa como fuente de carbono.

TABLA 4.

Concentración metabolitos en células AS-30D, incubadas en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Sustratos	GLUCOSA 5 mM		GLUTAMINA 4 mM		GLUTAMICO 10 mM	
	Basal	t_{40}	Basal	t_{40}	Basal	t_{40}
nmo/ 10^7 células.						
GLUCOSA	--	--	1.15±0.4 (5)	0.76±0.5 (5)	1.14±0.08 (4)	1.2±0.08 (4)
GLUTAMINA	0.26±0.01 (3)	0.5±0.05 (3)	--	--	0.3±0.01 (3)	0.15±0.008 (3)
GLUTAMICO	22±0.01 (3)	23±0.02 (3)	39.3±0.3 (4)	48.5±0.3 (4)	--	--
GLUCOGENO	1.31±0.5 (5)	1.1±0.7 (5)	0.66±0.2 (4)	0.8±0.3 (4)	0.87±0.3 (5)	0.94±0.3 (5)

Los valores representan la media ± desviación estandar. Los números entre paréntesis muestran el número de experimentos.

En presencia de concentraciones altas de glucosa (5mM), la célula tumoral no consume ninguno de los metabolitos endógenos evaluados (glutamina, glutamato, o glucógeno). Sin embargo, a pesar de que observamos ligeros cambios en presencia de los otros sustratos (glutamina y glutamato), éstos no fueron significativamente diferentes entre sí (la P calculada en cada caso fue mayor a 0.05), lo cual sugiere que no existe degradación de ningún sustrato endógeno cuando la célula es alimentada con fuentes externas.

Un dato importante a comentar es que cuando se realizaron los ensayos para determinar la glucosa y el glucógeno al tiempo basal y en presencia de los diferentes sustratos exógenos, las concentraciones de éstos no fueron las mismas que las calculadas en la tabla 1 para el mismo tiempo. Tal parece que las concentraciones basales calculadas en presencia de fuentes externas son menores que las calculadas en ausencia de ellas (ver tabla 1 y tabla 4), lo que podría explicarse por el estado nutricional de la rata. Sin embargo, obsérvese que las concentraciones calculadas de glucosa y de glucógeno en presencia de glutámico o de glutamina, durante el tiempo basal, son muy parecidas entre sí, lo que indica que en estas condiciones la cantidad de sustrato es menor que la reportada en ausencia de sustrato.

1.4 Determinación de los coeficientes de control de flujo para la vía de la fosforilación oxidativa, utilizando la aproximación de Gellerich y cols. [51].

Se analizó la distribución del control a nivel de la fosforilación oxidativa, en las células del hepatoma AS-30D, en ausencia de sustrato exógeno. Inicialmente se estimó la respiración absoluta de las células, encontrándose un valor de 80-100 ngAO/min/10⁷células. Estos valores de respiración son ligeramente mayores a los encontrados en hígado perfundido [77,78] (2.25 µmol de O₂/gramo de tejido húmedo, que corresponden a 78.7ngAO/10⁷células, debido a que 10⁷células tienen un peso húmedo de aprox 17.5±6 mg (n=4)); lo que indica que las células tumorales consumen oxígeno a alta velocidad. Para el ensayo, las células (10⁷células/ml) fueron incubadas en 1.9 ml de medio Ringer Krebs a 37°C.

La evaluación cuantitativa de los Ci se realizó a nivel de las siguientes enzimas: NADH ubiquinol-oxidoreductasa (Sitio I), Complejo b-c₁ (Sitio II), Citocromo c oxidasa (Sitio III) y ATP -sintetasa, utilizando el método de inhibición específica propuesto por Westerhoff y Tager [66], que consiste en inhibir específicamente a una

de las enzimas de la vía con inhibidores que entren a la célula, como la rotenona, la antimicina, el KCN y la oligomicina, respectivamente. Para corroborar los Ci obtenidos con estos inhibidores, se realizaron curvas de titulación con otros inhibidores específicos para cada enzima, como la venturicidina (ATP sintetasa [$10\text{-}700\text{ pmol}/10^7\text{ células}$]), el mixotiazol (Sitio II [$10\text{-}250\text{ pmol}/10^7\text{ células}$]) y la azida de sodio (citocromo c oxidasa [$0.5\text{-}60\text{ mM}$]).

Aparte de ser específicos (con la excepción del KCN, que puede reaccionar inespecíficamente con aldehídos y cetonas), estos inhibidores tienen la particularidad de poder atravesar libremente la membrana plasmática y llegar rápidamente a su sitio de unión; sin embargo, la oligomicina se caracteriza por ser un inhibidor de acción lenta. Por tanto, en las curvas de titulación con este inhibidor, se permitió que el inhibidor se equilibrara por unos minutos, hasta lograr un estado estacionario constante. En la figura 1 se muestran los registros de respiración de dos muestras celulares en presencia de A) oligomicina y B) KCN. Como se observa, el KCN inhibe rápidamente a la citocromo c oxidasa (en segundos) mientras que la oligomicina inhibe más lentamente a la ATP sintetasa (minutos).

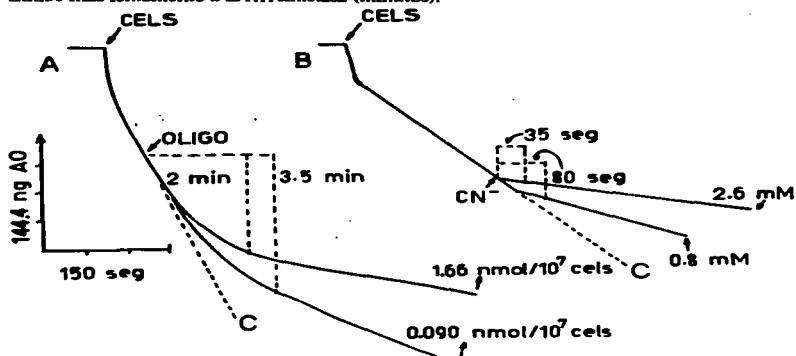


Figura 1 Inhibición de la respiración celular en presencia de A) oligomicina y B) KCN. Las líneas punteadas representan el tiempo de inhibición.

Cabe mencionar que hemos encontrado que en las células del hepatoma AS-SOD, a pesar de utilizar concentraciones saturantes del inhibidor, no se logra inhibir totalmente la respiración celular, lo cual indica la existencia de oxidasas no-mitocondriales insensibles a los inhibidores respiratorios. En la Tabla 5 se muestra que en presencia de la oligomicina se obtiene aproximadamente un 13% de respiración celular resistente, a pesar de utilizar 500 pmol/10⁷células. A este respecto, es importante comentar que la K_i para las mitocondrias de cerebro es de 0.3 a 1 pmol/mg de proteína mitocondrial [67]. Por tanto si 10⁷células corresponden a 1.3±0.3 mg de proteína total, entonces estamos añadiendo 380 pmol/mg prot total, concentración a la cual, teóricamente, se inhibe totalmente a la enzima. El porcentaje de respiración resistente encontrado en presencia de los otros inhibidores (venturicidina, rotenona, cianuro y azida), es semejante al encontrado con oligomicina, es decir, no hay diferencia significativa entre ellos (la P es mayor a 0.1). Si del 100% de respiración celular existe alrededor de un 10 a un 20% de respiración resistente a inhibidores respiratorios, entonces estamos demostrando que el resto (del 80 al 90%) de la respiración celular es de tipo mitocondrial y que además se utiliza para la síntesis de ATP. Por lo anterior, los valores obtenidos de respiración se normalizaron restando a todos ellos la respiración insensible.

Al titular la respiración celular en presencia de los diferentes inhibidores y utilizando la formulación propuesta por Gellerich [51] para inhibidores del tipo "fuertemente pegado", se obtuvieron los C_i que se ilustran en la Tabla 5, a partir de las gráficas con cada inhibidor (Figura 2 y Figura 3).

Una ventaja de utilizar la formulación propuesta por Gellerich y cols. [51] es que no solo se obtienen los C_i para cada enzima, sino que se obtienen dos parámetros importantes para el sistema: la K_d, constante de disociación del complejo Enzima-Inhibidor y la E₀, concentración de enzima total en la mitocondria, suponiendo una estequiometría de 1:1.

Tabla 5

Valores de C_i , K_d y E_o calculados a partir de la inhibición de la respiración de las células del hepatoma AS-30D

Sitio	K_d pmol/ 10^7 células.	E_o pmol/ 10^7 células.	C_i	% de resp. insensible	inhibidores
NADH- ubiquinol oxidoreductasa.	9 ± 1 (4)	43 ± 5 (4)	0.3 ± 0.1 (4)	13 ± 4 (4)	rotenona
ATP sintetasa	0.3 ± 0.1 (3)	76 ± 11 (3)	0.02 ± 0.006 (3)	13 ± 8 (3)	oligomicina
	0.9 ± 0.04 (3)	115 ± 26 (3)	0.016 ± 0.08 (3)	20 ± 9 (3)	venturicidina
citocromo b-c ₁	0.007 ± 0.000 4 (4)	21 ± 3 (4)	0.023 ± 0.000 9 (4)	16 ± 4 (3)	antimicina
	0.08 ± 0.05 (3)	65 ± 0.05 (3)	0.01 ± 0.005 (3)	9 ± 2 (3)	mixotiazol
Citocromo .Oxidasa	0.047 ± 0.01 (3)	0.72 ± 0.1 (3)	0.008 ± 0.004 (3)	18 ± 6 (3)	Azida
	0.025 ± 0.016 (4)	0.6 ± 0.05 (4)	0.04 ± 0.01 (4)	8 ± 3 (4)	KCN

Los valores representan la media \pm desviación estandar. El número de experimentos se muestra entre paréntesis.

En las figuras 2 y 3 se ejemplifican las curvas de titulación y las curvas teóricas obtenidas con el programa de ajuste para regresión no-lineal, Graph Inplot-4. Se grafica en el eje de las ordenadas el porcentaje de respiración, considerando que el 100% corresponde a la respiración mitocondrial no inhibida, contra la concentración del inhibidor en $\text{pmol}/10^7$ células o mM, en el eje de las abscisas.

El C_i del sitio I de la cadena respiratoria presenta el valor más elevado (0.3), mientras que las otras enzimas tienen valores de C_i menores a 0.1. Evaluando los C_i obtenidos para cada enzima con otros inhibidores específicos (Figura 4), encontramos que no existe cambio en el valor del C_i , demostrando que, independientemente del inhibidor utilizado, el porcentaje de control siempre es el mismo, es decir, los valores obtenidos son confiables.

Un segundo parámetro que nos proporciona la formulación de Gellerich y cols. [51] es la cantidad de enzima total. Al respecto, encontramos que las cantidades de todas las enzimas evaluadas, con excepción de los sitios I y II, son parecidas a las reportadas para las mitocondrias aisladas de AS-30D [79] y cerebro [66]. Los sitios I y II presentan valores muy por debajo de los anteriormente citados.

Para realizar la comparación tomamos en cuenta que 10^7 células corresponden a 1.3 ± 0.3 mg de proteína total ($n=3$); por tanto, si comparamos la E_o de la ATP sintetasa de las mitocondrias de cerebro (alrededor de $50 \text{ pmol}/\text{mg prot}$) contra la E_o encontrada en las células del hepatoma ($58 \text{ pmol}/\text{mg prot total}$) nos da un valor muy cercano entre sí; esto mismo sucede cuando se compara la E_o del Sitio III en ambos sistemas. Sin embargo, en el caso del Sitio I, la E_o reportada en mitocondrias aisladas de cerebro y AS-30D oscila alrededor de $120\text{-}150 \text{ pmol}/\text{mg prot}$, mientras que la encontrada en las células tumorales AS-30D ($33 \text{ pmol}/\text{mg prot total}$) es un valor muy inferior al encontrado en mitocondria *in vitro*.

Por otro lado, los valores de la constante de disociación (K_d) encontrados en mitocondrias *in situ* en las células tumorales de AS-30D son muy parecidas a las ya reportadas para otras mitocondrias aisladas [66], lo cual implica que la interacción específica del inhibidor con la enzima correspondiente no se modificó por la presencia de otras barreras de permeabilidad presentes en las células intactas.

Es importante comentar que el sistema fosforilante no sólo se encuentra integrado por las enzimas que componen la cadena respiratoria y la ATP sintetasa: las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, así como el acarreador de fosfato, piruvato y la translocasa de adenín nucleótidos también se encuentran dentro del sistema. A este

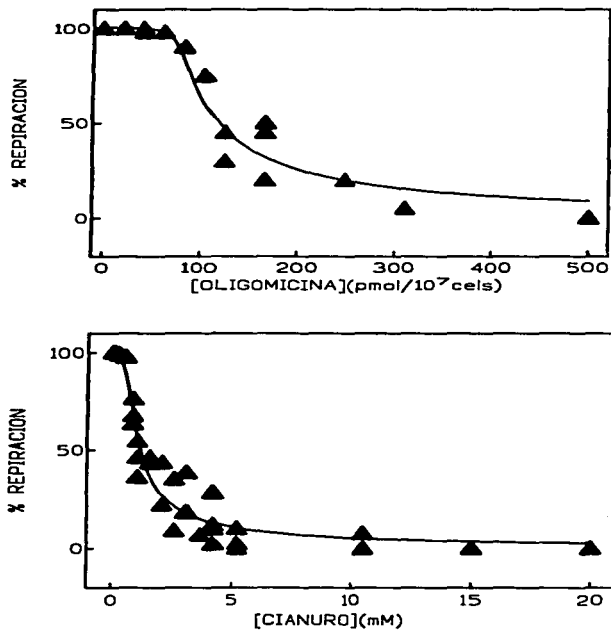


Figura 3. Curvas de titulación que muestran los puntos experimentales de las diferentes muestras celulares en presencia de oligomycin ($n=3$) o KCN ($n=4$).

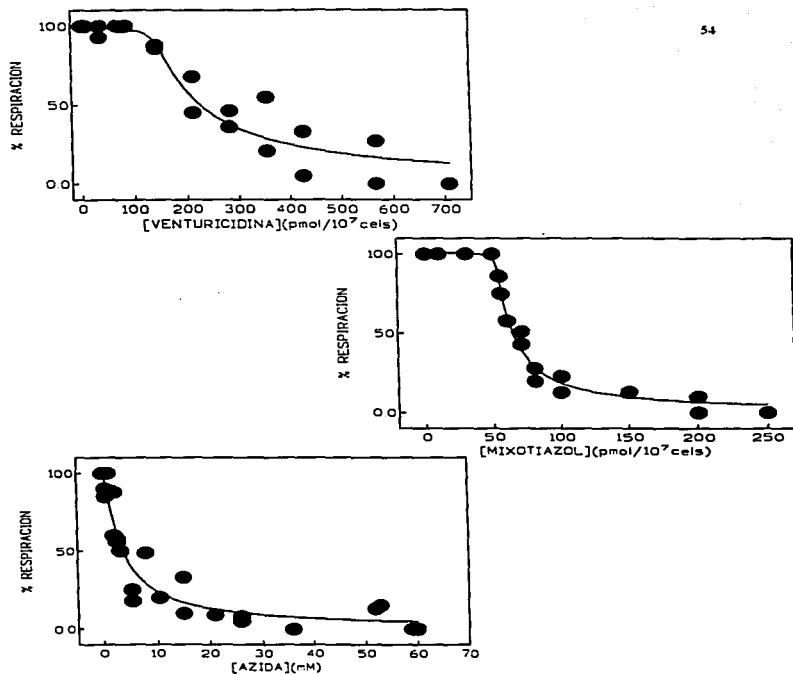


Figura 4. Curvas de titulación que muestran los puntos experimentales de diferentes muestras celulares en presencia de venturicidina, mixotiazol o azida de sodio.

respecto, la mayoría de los autores que demuestran cuantitativamente cuales son las enzimas que controlan la vía de fosforilación oxidativa [48,67,80], se inclinan a pensar que el acarreador de ATP/ADP es una etapa limitante. Lamentablemente, el carboxiatractilósido y el atractilósido (inhibidores específicos de la translocasa) así como el α -ciano-4-hidroxicinamato (inhibidor del transporte de piruvato) no cruzan la membrana plasmática [81], por lo que estos ensayos no pudieron realizarse, a pesar de que las células tumorales fueron incubadas a 30°C durante largos periodos de tiempo (50-70 minutos).

1.5 Evaluación del efecto Crabtree en células tumorales AS-30D.

El efecto Crabtree, ó inhibición de la respiración por glucosa, desoxiglucosa y otras hexosas [82,83], es una característica distintiva de las células tumorales de rápido crecimiento. La figura 5 muestra un experimento representativo de una $n=4$ de los diferentes porcentajes de inhibición de la respiración celular en función de la concentración de A) glucosa o B) fructosa.

Como se observa en la figura 5-A, la glucosa provoca una inhibición parcial de la respiración celular a concentraciones mayores o iguales a 0.1 mM, a concentraciones menores de 100 μ M (se probaron 10 y 50 μ M), la respiración no se ve afectada por la hexosa. Sin embargo, dependiendo de la concentración de glucosa utilizada, la respiración celular puede restaurarse a los 4-7 minutos. A concentraciones mayores de 0.5 mM no existe restauración de la respiración, por lo menos a tiempos menores de 15 minutos. El comportamiento de la fructosa es muy diferente al encontrado con la glucosa. La diferencia que encontramos al comparar el efecto Crabtree en presencia de glucosa y fructosa es que (a) con ésta última se requieren concentraciones mayores para obtener el mismo porcentaje de inhibición (con 0.1 mM de glucosa se inhibe aprox. un 13%, mientras que se necesita 1 mM de fructosa para inhibir solo el 7%) y (b) en presencia de fructosa no existe recuperación de la respiración a pesar de utilizar concentraciones muy bajas.

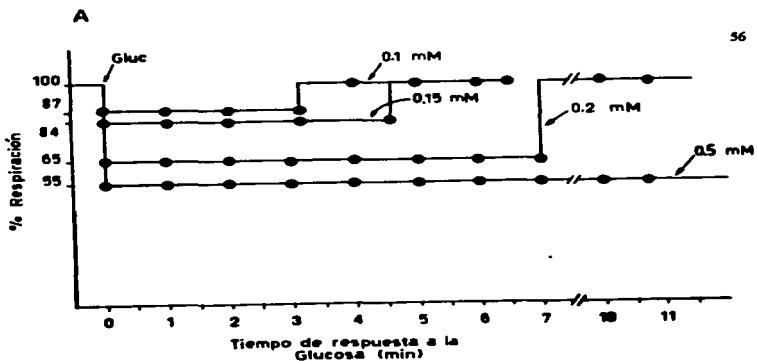


Figura 5-A. Esquema representativo que muestra el porcentaje de inhibición de la respiración en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.

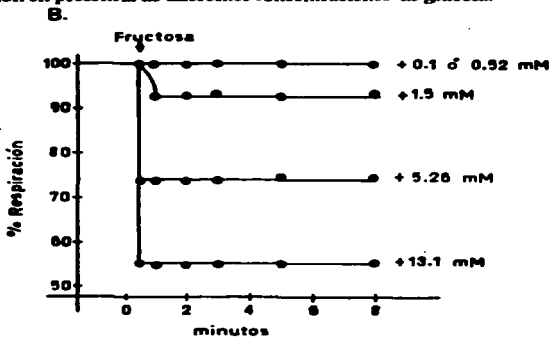


Figura 5-B. Esquema representativo que muestra el porcentaje de inhibición de la respiración en presencia de diferentes concentraciones de fructosa.

1.6 Reducción de piridin nucleótidos en presencia de concentraciones conocidas de glucosa

La actividad de las deshidrogenasas citosólicas y mitocondriales puede ser monitoreada por el incremento en el nivel de NAD (P) H. Tal parece que la célula tumoral AS-30D incrementa su poza de equivalentes reductores en presencia de concentraciones conocidas de glucosa (de $80\mu\text{M}$ a 4.5mM). Sin embargo, cuando se adiciona $12.5\mu\text{M}$ del inhibidor de la ATP sintetasa, oligomicina, el porcentaje de piridin nucleótidos aumenta considerablemente sobre el control (células sin oligomicina) (Figura 6).

A pesar de que la máxima reducción de piridin nucleótidos se obtuvo a 4.4mM de glucosa, tanto en presencia como en ausencia de oligomicina, los porcentajes de reducción fueron muy diferentes. Mientras que en la condición control el porcentaje alcanzado no excede el 64%, en presencia del inhibidor se obtiene un 95% de reducción máxima.

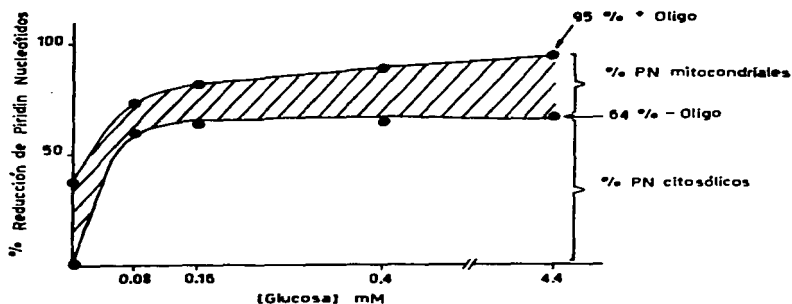


Figura 6. Porcentaje de reducción de piridin nucleótidos en presencia y ausencia de oligomicina ($12.5\mu\text{M}$) y concentraciones crecientes de glucosa ($n=3$). Las células fueron incubadas como se describe en la sección 1.10 de Material y Métodos.

1.7. Concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} en células tumorales de AS-30D.

Como se ha descrito, el Ca^{2+} y el Mg^{2+} son esenciales en el desarrollo de la célula tumoral; el primero, porque participa en una gran variedad de reacciones importantes a nivel celular y mitocondrial, además de estar involucrado en el efecto Crabtree, y el segundo, por ser cofactor de varias reacciones celulares incluida la duplicación celular.

Por lo tanto, fue necesario determinar la concentración libre citosólica de estos cationes durante el estado estacionario, en el que el Sitio I de la cadena respiratoria gobierna el flujo de la fosforilación oxidativa. Las determinaciones se realizaron en presencia de glucosa 5mM, fructosa 5mM, glutámico 10mM y glutamina 4mM como fuente de carbono, durante 40 minutos.

1.7.1 Concentración de Ca^{2+} .

La concentración basal de Ca^{2+} libre en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) en células tumorales AS-30D se calculó alrededor de 90 nM, independientemente de la fuente de carbono externa. Como se observa en la tabla 6, independientemente del sustrato utilizado se produce un incremento significativo en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ del t_0 al t_{40} ($P < 0.05$).

Si se comparan los resultados obtenidos en presencia y en ausencia de sustrato, no existe diferencia significativa en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ($P > 0.05$), es decir, cuando el análisis estadístico se realiza comparando el control contra el de glutamina, glutamato, fructosa o glucosa a cada tiempo evaluado (t_0 del control vs t_0 de glucosa, etc). Pero si el análisis estadístico se realiza comparando el t_0 contra el t_{40} de cada condición se observan diferencias significativas.

Por tanto, existe un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que no está asociado a la oxidación de cualquiera de los sustratos evaluados. Cabe mencionar que las células cargadas con el indicador respiran igual que las células control (sin indicador) a cada tiempo evaluado (alrededor de 100 nmol ngAO/min/ 10^7 células.), por lo que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ no afecta la respiración celular.

Para demostrar que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ no era el resultado de la liberación del indicador debido a muerte celular durante la incubación, se determinó la viabilidad en los diferentes tiempos (principalmente al t_{40}) en presencia de todos los

sustratos evaluados, y se encontró que las células tumorales, al t_{60} , presentan una viabilidad del 98.5% vs el 99% encontrado en el control.

En la Figura 7-A se muestra un trazo de fluorescencia control, en donde se observa la calibración de la señal, registrándose la fluorescencia máxima y la mínima. Al incrementarse el tiempo de incubación en presencia del indicador, se observa un incremento en la señal de fluorescencia como resultado del incremento en la $[Ca^{2+}]_c$, que va de 100 nM hasta 170 nM al t_{60} , independientemente del sustrato utilizado. Al añadir un exceso de EGTA (agente quelante de Ca^{2+}), la señal de fluorescencia disminuye un mismo valor a los diferentes tiempos evaluados, demostrando que la cantidad de indicador extracelular no aumenta por la prolongada incubación efectuada (Figura 7-B).

TABLA 6

Variación en la $[Ca^{2+}]_c$ de A5-30D en presencia de diferentes fuentes de carbono a través del tiempo.

	tiempo 0	tiempo 25	tiempo 40
	nM		
CONTROL	82.5±4.2 (5)	134.5±13.5 (5)	170.2±20 (5)
Gluc 5mM	94.7±7.4 (5)	115.4±0.4 (5)	145.9±14.7 (5)
Fruct 5mM	92.1±11 (5)	114.9±13.8 (5)	158.8±18.2 (5)
Glut 10mM	79.9±9 (5)	106.6±7.3 (5)	140.3±13 (5)
Gln 4mM	81.3±8.2 (5)	131.6±10.4 (5)	164.7±21.8 (5)

Los valores muestran el promedio ± desviación estandar de 5 preparaciones diferentes

El EGTA que no penetra al interior de la célula, atrapa al Ca^{2+} extracelular, evitando su entrada, de tal manera que el indicador intracitosólico, al no estar complejoado con el Ca^{2+} , no emite fluorescencia.

Para identificar la procedencia del Ca^{2+} citoplasmático, ya sea de origen mitocondrial, de retículo endoplásmico ó del espacio extracelular, se incubaron a las células tumorales con inhibidores de cada uno de los organelos. Los experimentos se realizaron de igual manera que en la Figura 7, pero las células tumorales fueron incubadas en presencia de los diferentes inhibidores:

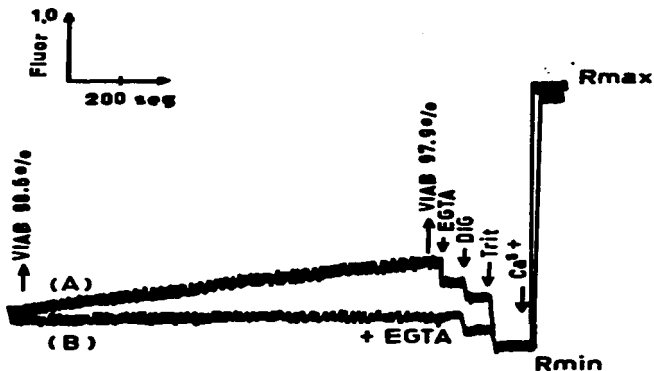


Figura 7. Incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través del tiempo en las células del hepatoma AS-30D cargadas con Indo-1AM. En (A) se muestra el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ausencia de sustrato oxidable. En presencia de EGTA 2mM, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permanece sin cambio a través de los tiempos evaluados.

Para descartar la participación de (a) mitocondria, se empleó a la oligomicina (1 nmol/10⁷ células) ó CCCP (10 μ M), (b) retículo endoplásmico, se emplearon inhibidores de los receptores sensibles a ATP, como el rojo de rutenio (10 μ M) [84], inhibidores de la ATPasa de Ca²⁺-sensible a ATP, como la taspigargina (10 μ M) [85] y de los receptores que provocan liberación de Ca²⁺ estimulada por Ca²⁺ (*calcium-induced, calcium release*), también llamados receptores a ryanodina, como la misma ryanodina (5 μ M), el rojo de rutenio (10 μ M), el dantroleno (10 μ M), la teofilina (1 y 10 μ M) y la cafeína (10 μ M) [86,87,88] e (c) inhibidores de los canales de Ca²⁺-dependientes de voltaje de membrana plasmática como el verapamil (2.5 y 10 μ M) [89].

En presencia de cualquier inhibidor, el incremento en la [Ca²⁺]_i es la misma que la encontrada en el experimento control, es decir, en las células tumorales no estamos encontrando sensibilidad a ninguno de los inhibidores, a pesar de utilizar altas concentraciones. Por los datos anteriores, podemos sugerir que en las células tumorales probablemente no están activos los receptores sensibles a ryanodina, ya que no se observa una señal sin cambio; si hubiera sensibilidad por parte de los receptores, se obtendría una señal parecida a la encontrada en presencia de EGTA (Figura 7-A). Por otro lado, cuando la célula es expuesta al verapamil y a teofilina, y no hay cambio en la fluorescencia con respecto a la condición control, nos indica que en este tipo celular probablemente no existen los canales dependientes de voltaje de la membrana plasmática, como los que se encuentran en los cardiomiocitos [88]. Sin embargo, lo que es evidente es que el Ca²⁺ debe de provenir del espacio extracelular, debido a que al eliminar el Ca²⁺ externo (con EGTA 2mM o bien en un medio de Ringer-Krebs sin Ca²⁺), no se observa incremento en la [Ca²⁺]_i a través del tiempo.

1.7.2 Concentración de Mg²⁺.

Al igual que en el caso del Ca²⁺, se realizaron las determinaciones de [Mg²⁺]_i. Sin embargo, a pesar de que el indicador utilizado, el Mag-Fura 2, es selectivo para el magnesio, también es capaz de complejarse con el Ca²⁺. En la figura 8 se muestra que los incrementos en la fluorescencia no son debidos al incremento en la [Mg²⁺]_i, sino al incremento en la [Ca²⁺]_i. Debido a lo anterior, en nuestras condiciones experimentales no se pudieron determinar las concentraciones de Mg²⁺ en presencia y ausencia de sustrato oxidable.

En la Figura 8-A se observa un incremento en la señal de la fluorescencia que supusimos era debida a movimientos intracelulares de Mg^{2+} . Al añadir un exceso de Mg^{2+} (10 μM) la señal no cambió con respecto al control, demostrando que el indicador nunca se complejó con el catión (esperabamos un incremento evidente en presencia de la alta concentración de Mg^{2+}). Sin embargo, lo anterior se puede explicar si consideramos que a 1 mM (concentración basal de Mg^{2+} utilizada en el medio de Ringer-Krebs) el transportador de Mg^{2+} en las células tumorales pudiese estar saturado, por lo que no vemos un incremento en la fluorescencia.

El experimento definitivo que nos demostró que no estamos observando variaciones en la concentración de Mg^{2+} fue cuando las determinaciones se realizaron en un medio sin Mg^{2+} extracelular (Figura 8-B), en donde encontramos un incremento en la fluorescencia ligeramente mayor al encontrado en la condición control. Para corroborar lo anterior, realizamos otro experimento en presencia del agente quelante selectivo para Ca^{2+} , EGTA (Figura 8-C), y concentraciones saturantes de Mg^{2+} (10 mM). Observamos que se abatió el incremento en la fluorescencia. Por tanto, podemos concluir que para determinar variaciones en la $[Mg^{2+}]_i$, esta técnica no es tan selectiva, sobre todo si tenemos fluctuaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, dentro de la célula.

A pesar de que en nuestros experimentos utilizando Mag-Fura 2 lo que probablemente estamos cuantificando es el Ca^{2+} (por los datos obtenidos con EGTA), Hofer y cols. [90] han demostrado que el Mag-Fura 2 sólo se compleja con Ca^{2+} cuando la $[Ca^{2+}]_i$ está en el orden μM (la K_d del Mag-Fura 2 para el Ca^{2+} la calcularon en 52 μM); pero nosotros encontramos que esto también ocurre con concentraciones de Ca^{2+} en el orden nanomolar (ver Tabla 6). Por lo anterior, es conveniente llevar a cabo el ensayo con otros indicadores selectivos para el magnesio como el Mag-Indo, que tiene menor afinidad por el Ca^{2+} que el Mag-Fura-2 [69].

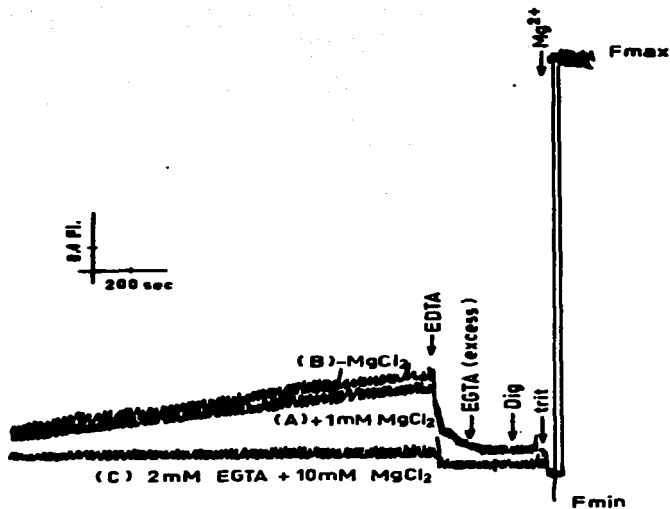


Figura 8. El cambio en la fluorescencia medida con el indicador Mag-Fura 2 no se debe a cambios en la $[Mg^{2+}]_i$ sino a cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. En (A) se muestra un incremento en la fluorescencia de células cargadas con el indicador igual que (B) en ausencia de Mg^{2+} . Al adicionar EGTA 2 mM la fluorescencia se nulifica aún en presencia de concentraciones saturantes de $MgCl_2$ (10 mM) (C).

CAPITULO V

DISCUSION.

1. Metabolismo intermediario de las células tumorales AS-SOD.

La elevada actividad glucolítica encontrada en AS-SOD (rápida oxidación de glucosa y acumulación de lactato) concuerda con los datos reportados para otras líneas tumorales, como el carcinosarcoma de Walker [7], el hepatoma de Morris y el hepatoma de Novikoff [1]. Bustamante y Pedersen [3] han descrito que la elevada glucólisis en estas líneas tumorales puede deberse a la elevada actividad de la hexocinasa tumoral. Además de la glucosa, otros metabolitos se consumieron por las células tumorales AS-SOD (Tabla 1). La degradación de cuerpos cetónicos y glutamato, así como la glucogenólisis, también se encuentran activas. De hecho, Briccoe y cols. [16] también encontraron degradación de AcAc en AS-SOD, lo que concuerda con nuestros datos en esta última línea tumoral. Este comportamiento no es claro en otras líneas tumorales de rápido crecimiento; por ejemplo, en el carcinosarcoma de Walker [7] y en el hepatoma de Morris [9], el AcAc se oxida rápidamente (igual que en AS-SOD), mientras que el β -OHbutirato se acumula a través del tiempo. En Ehrlich y Ehrlich Letré también existe consumo elevado de glucosa y acumulación de láctico [2], pero no se ha evaluado el contenido de cuerpos cetónicos ni glucógeno, y no parece haber oxidación de piruvato, por la inhibición de la PDH tumoral por acetoina [11,12]. En el hepatoma de Novikoff no se ha evaluado la utilización de estos metabolitos [2], debido a que se argumenta que el metabolismo es el mismo que el encontrado en Ehrlich, pero a pesar de que pertenecen al grupo de líneas tumorales de rápido crecimiento, todas ellas pueden presentar características metabólicas muy diferentes.

1.1 Degradación de cuerpos cetónicos, glutamato y glucógeno por las células AS-SOD en ausencia de sustrato oxidable.

En contraste con los hepatocitos, que no oxidan activamente los cuerpos cetónicos (β -OHbut y AcAc) debido a los bajos niveles de succinil CoA acetoacetyl CoA transferasa, las células tumorales de AS-SOD los consumen de manera constante [16].

El consumo de β -OHbut es inesperado, ya que se ha reportado una baja actividad de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa en AS-3OD [17], mientras que el consumo de AcAc puede deberse a la rápida generación de acetil CoA, el cual es utilizado durante la lipogénesis y la síntesis de colesterol, que están muy aceleradas en las células de AS-3OD [13,16]. De hecho, se ha reportado que el AcAc puede ser consumido en las células AS-3OD, tanto en el citosol como en mitocondria, por enzimas diferentes (Ver figura 3 de la introducción).

Por otro lado, las células tumorales también consumen sustratos mitocondriales importantes como el glutamato y la glutamina. La oxidación de glutamato puede indicar que (1) es un metabolito utilizable para proveer los esqueletos carbonados que alimentan al ciclo de Krebs, debido a la baja oxidación de piruvato [12,13] y (2) la glutamato deshidrogenasa tumoral o bien las transaminasas tumorales son muy activas en las células AS-3OD. Posiblemente las transaminasas se encuentren degradando glutamato para transformarlo en α -cetoglutarato (ciclo de Krebs) y aspartato (síntesis de purinas y pirimidinas) [2].

El glucógeno es otro de los metabolitos importantes que las células tumorales de AS-3OD consumen cuando se incuban en ausencia de sustratos (Tabla 1). Lo anterior puede ser atribuido a la alta actividad de la vía glucogenolítica, lo que nos hace suponer que en este tipo celular existe una fuente constante de glucosa.

1.2. Baja oxidación de piruvato, glutamina y ATP en las células tumorales AS-3OD, en ausencia de sustrato oxidable.

A pesar de que se ha descrito que en mitocondrias de AS-3OD la oxidación de piruvato es rápida [3,44], no encontramos cambio en su concentración a través de los tiempos evaluados. Esto puede explicarse de dos maneras: (1) la velocidad de producción de piruvato a partir de la glucólisis es la misma que la velocidad de degradación de piruvato por la FDH tumoral, por lo que el intermediario (piruvato) siempre permanece constante ó (2) la acetoina inhibe a la FDH tumoral de AS-3OD, teniendo como consecuencia la baja utilización de piruvato [12,13].

Por otro lado, en la mayoría de las células tumorales de rápido crecimiento se ha propuesto que la glutamina es el metabolito más frecuentemente utilizado, aún en presencia de concentraciones altas de glucosa [20]. Sin embargo, en nuestras condiciones, la glutamina no fue el sustrato consumido preferencialmente. Tal parece

que en las células tumorales AS-30D, en donde el ciclo de Krebs no está truncado, el glutamato es suficiente para dar los carbonos necesarios para formar el α -cetoglutarato, sin necesidad de utilizar rutas alternativas como la de la glutamina.

Como la glutamina y el glutamato entran al ciclo de Krebs por el mismo sitio, posiblemente bajo nuestras condiciones exista una baja actividad del transportador de glutamina, ó bien, de la glutaminasa tumoral, comparada con la actividad de las otras enzimas involucradas en la degradación del glutamato, como es la glutamato deshidrogenasa.

En el caso del ATP, no se encontró cambio alguno en los tiempos evaluados. Durante la proliferación celular, el mayor aporte de ATP es obtenido de la mitocondria [1,27,28]. Si la velocidad de producción del ATP mitocondrial es igual a la velocidad de consumo en los procesos como la división celular y la síntesis de proteínas, la poza de ATP deberá permanecer sin cambio.

1.3 Cuantificación de los metabolitos en el líquido de ascitis, en ausencia de sustrato oxidable

Estos metabolitos también fueron cuantificados en el líquido de ascitis (fracción libre de células) y encontramos que de todos ellos, la concentración de glucosa ($22\mu\text{M}$) es la que se encuentra muy por debajo del valor obtenido en la sangre de la rata con hepatoma (2-4 mM), sugiriéndonos varias hipótesis:

1. La presencia de una glucosa oxidasa extracelular que transforme a la glucosa en gluconato, por lo que la glucosa no se encuentra en el líquido de ascitis.
2. La posible relación íntima entre capilares sanguíneos y células tumorales.
3. El transporte de glucosa de los capilares sanguíneos al interior de la célula sea tan rápido que no se detecte glucosa en el líquido de ascitis.

La primera hipótesis puede ser descartada, pues realizando ensayos en el líquido de ascitis, agregando una concentración conocida de glucosa, no se observó su degradación.

De los otros metabolitos encontrados en el líquido de ascitis, el β -OHbut (0.04 mM) también está disminuido con respecto a su concentración en la sangre, posiblemente debido al rápido consumo del metabolito por las células. Para el lactato, glutamato, glutamina, AcAc y piruvato, las concentraciones oscilaron en el intervalo reportado para el plasma sanguíneo [72-74].

La concentración de oxígeno en el líquido del hepatoma se encontró relativamente alta (Tabla 2); esta observación nos hace suponer que la cadena respiratoria no está limitada por el aporte de O_2 (la Km aparente para la citocromo c oxidasa es de $1 \mu M$ [92]), es decir, podemos considerar que las células pueden llevar a cabo procesos metabólicos dependientes de O_2 , como se ha establecido para la mayoría de las células ascíticas [93]. Además, cabe mencionar que esta concentración es muy parecida a la que se encuentra en la vena hepática [94,95]. Este dato nos hace suponer también que en las células tumorales AS-SOD el efecto Pasteur es negativo, debido a que encontramos glucólisis activa aún en presencia de concentraciones saturantes de oxígeno. Sin embargo, no se ha reportado en la literatura experimentos en donde se haya ensayado directamente tal efecto en células tumorales.

1.4 Determinación del estado redox en las células y las mitocondrias de la línea tumoral AS-SOD

El incremento en la relación NADH/NAD⁺ citosólica y mitocondrial, que se obtuvo a partir de las relaciones lactato/piruvato y β -OHbut/AcAc, así como del porcentaje de NAD(P)H medido por fluorescencia intrínseca de las células, nos sugieren que no existe limitación en la concentración de piridín nucleótidos disponibles para las deshidrogenasas citosólicas y mitocondriales. El incremento en piridín nucleótidos mitocondriales a través del tiempo sugiere que posiblemente la cadena respiratoria no se encuentra limitada por su sustrato, esto es, la baja disponibilidad inicial de NADH disminuye con el tiempo debido a la elevada actividad de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs. De hecho, los experimentos de fluorescencia en células tumorales revelaron que de un 95% de piridín nucleótidos totales (NADH + NAD(P)H), más del 50% pertenecen a piridín nucleótidos mitocondriales, exclusivos para la síntesis de ATP (figura 6). Este es otro dato más que sostiene la hipótesis de que en estas células existe un mayor porcentaje de piridín nucleótidos mitocondriales y citosólicos en estado reducido que pueden ser útiles para reacciones dependientes de NAD⁺.

La relación NADH/NAD⁺ citosólica calculada en AS-SOD es mayor a la encontrada en hepatocitos [74,75], pero muy semejante a la encontrada en hepatocitos tratados con etanol [96]. Se ha descrito que este incremento en la relación

NADH/NAD⁺ citosólica en células tumorales puede ser la señal que induzca la progresión de la fase G₀ a la fase G₁ del ciclo celular [97].

Algunos autores proponen [98] que en hepatocitos puede existir un incremento en la poza de equivalentes reductores debido a (1) la estimulación hormonal o (2) las alteraciones en la disponibilidad de los sustratos metabólicos. En las células tumorales AS-30D se observaron cambios en las concentraciones de metabolitos que explican los cambios en la poza de equivalentes reductores.

Por otro lado, la relación NADH/NAD⁺ mitocondrial en células de hepatoma AS-30D es muy semejante a la de hepatocitos [75], las mitocondrias aisladas de hígado [76] y las células tumorales del carcinoma de Walker 56 [7].

1.5 Determinación de los principales metabolitos consumidos por las células tumorales AS-30D, en presencia de diferentes fuentes de carbono.

En la tabla 4 se muestra que en presencia de concentraciones altas de glucosa (5mM), la célula tumoral obtiene todo su aporte nutricional de ésta, sin consumir otra fuente de carbono endógena (glutamina, glutamato). En estas condiciones, se observa que la concentración de el glucógeno no varía. Si la hipótesis es que se nutren exclusivamente de glucosa exógena, entonces, al no consumir la glucosa endógena, la concentración de glucógeno debería incrementarse, condición contraria a la reportada en la Tabla 1. Es posible también suponer que en estas condiciones, la glucosa exógena está inhibiendo la respiración (efecto Crabtree), y por esta razón, los metabolitos que alimentan al ciclo de Krebs se consumen lentamente por las deshidrogenasas.

Por otro lado, la condición más cercana a la fisiológica es aquella realizada en presencia de glutamina 4 mM, debido a que fue el metabolito que se encontró en mayor concentración en el líquido de ascitis. Al respecto, encontramos que ninguno de los sustratos evaluados (glucosa, glutamato y glucógeno) varía su concentración a través del tiempo, sugiriéndonos que en presencia de glutamina, la velocidad de producción y degradación de estos metabolitos es igual, por lo que todas las concentraciones permanecen sin cambio. Sería interesante determinar en este estado estacionario el consumo endógeno de glutamina en presencia de glutamina externa, para establecer si éste es el metabolito más oxidado en condiciones fisiológicas, como se ha reportado para Ehrlich [19,20]. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando se incubaron a las célula AS-30D en presencia de glutamato 10 mM. Tal parece que

independientemente de la fuente externa, Las células consumen preferencialmente la fuente exógena que se encuentra a su disposición, más que los metabolitos endógenos.

Es importante tratar de correlacionar estos datos con la velocidad de glucólisis, con la idea de determinar la contribución relativa de esta vía al aporte de energía.

1.6 Determinación del principal punto de control de la fosforilación oxidativa, utilizando la aproximación de Gellerich y cols. [51].

Utilizando la teoría de control metabólico [99, 100] se calcularon los coeficientes de control de flujo (Ci) de algunas de las enzimas que participan en la fosforilación oxidativa. Se utilizaron dos aproximaciones matemáticas para calcular los Ci: (A) la aproximación de Westerhoff y Tager (utilizando la fórmula para inhibidores irreversibles) [66] y (B) la aproximación de Gellerich (utilizando la fórmula para inhibidores pseudoirreversibles, del tipo no competitivos o fuertemente pegado) [51].

Las ventajas y desventajas del uso de cualquiera de las dos aproximaciones se muestra en la sección 1.7 de la Introducción. Para evaluar los Ci de la fosforilación oxidativa en las células del hepatoma AS-30D, se utilizó la aproximación de Gellerich y cols. [51]. En cualquier vía metabólica, todas las enzimas participan regulando el flujo en una cierta proporción; por tanto, la suma de los Ci de cada una de las enzimas que participan en la vía es igual a la unidad, o si se quiere visualizar de otra manera, es igual al 100% (Teorema de la Sumatoria.) [99]. El Sitio I (NADH-ubiquinol oxidoreductasa) (Tabla 5) es la única enzima que presenta un valor de Ci predominante, mientras que la ATP sintetasa, la citocromo c oxidasa y el complejo b-c₁ presentan valores de Ci más pequeños. Visto de manera porcentual, el Sitio I controla aproximadamente el 30% del flujo total de la vía, mientras que los demás Sitios de la cadena respiratoria y la ATP sintetasa controlan menos del 6% en conjunto.

Contrario a lo reportado en las mitocondrias aislada del hepatoma AS-30D [48], la ATP sintetasa, en mitocondrias *in situ*, no ejerce control significativo. Aplicando el Teorema de la Sumatoria, la cadena respiratoria y la ATP sintetasa ejercen solo el 35.1%, sugiriendonos que el resto puede estar distribuido en otras enzimas no evaluadas en este sistema, como son la translocasa de piridín nucleótidos, el acarreador de piruvato, o bien las deshidrogenasas del ciclo de Krebs mitocondriales.

A pesar de que encontramos un incremento en la relación NADH/NAD⁺, lo que sugiere una abundante fuente de sustrato para la cadena respiratoria, es importante

tener en cuenta que el NADH todavía puede llegar a ser limitante si su concentración se encuentra por abajo de la Km de las deshidrogenasas mitocondriales [24,101]. Por ejemplo si el valor encontrado para la relación NADH/NAD⁺ mitocondrial es cercano a 0.3 en el t₆₆ entonces este valor, a pesar de ser mayor que el obtenido al t₀ indica que la [NADH] sigue siendo limitante para la cadena respiratoria; entonces, no es sorprendente suponer que un control significativo lo puedan ejercer las deshidrogenasas de ciclo de Krebs, y como no se ha determinado su control, la primer enzima que sienta la baja disponibilidad de NADH (el Sitio I de la cadena respiratoria) es la que es limitante. Por lo anterior, sería interesante evaluar la actividad de estas deshidrogenasas tumorales durante el estado estacionario en el que se evaluó al Sitio I de la cadena respiratoria.

El control que está ejerciendo el Sitio I sobre el flujo de la fosforilación oxidativa en nuestro sistema puede deberse a que se ha encontrado una menor cantidad de la enzima (Eo) NADH-ubiquinol oxidoreductasa, en las células tumorales que la encontrada en otras mitocondrias como las de cerebro [67]. La concentración de las enzimas (Eo) restantes (citocromo oxidasa y ATP sintetasa) es igual a la reportada para las mitocondrias de cerebro y de AS-30D [67,79].

Cabe mencionar que la similitud encontrada entre el porcentaje de respiración insensible a oligomicina (13-20%) y los porcentajes de respiración insensible a los demás inhibidores indica que existe arriba de un 80% de respiración celular de tipo fosforilativa, es decir, utilizada exclusivamente para la síntesis de ATP.

A pesar de que en las mitocondrias aisladas del hepatoma AS-30D [48] y en otros tejidos evaluados [80,102], quienes ejercen mayor grado de control son la translocasa de adenín nucleótidos, la ATP sintetasa y las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, no es sorprendente que en nuestro sistema el control lo ejerza la primer enzima de la cadena. Esto puede explicarse porque se ha observado que la distribución del control varía de acuerdo a las condiciones en que se encuentra el sistema, además de que, en ninguno de los tejidos hasta ahora estudiados (corazón, riñón, hígado y cerebro) [66,80,102,103], existe un sólo punto de control, ya que siempre se distribuye a lo largo de todas las enzimas que integran la ruta metabólica.

1.7 Papel del Ca^{2+} en el efecto Crabtree en las células tumorales AS-30D

La evidencia del fenómeno Crabtree (inhibición de la respiración en presencia de hexosas) en las células tumorales se demostró en la línea AS-30D; sin embargo, el comportamiento de las dos hexosas ensayadas fue diferente. La inhibición de la respiración celular fue evidente tanto en presencia de glucosa como de fructosa, aunque hubo diferencias notorias. En el caso de la glucosa, observamos recuperación de la respiración celular sólo a concentraciones bajas de glucosa exógena (de 0.1 a 0.2mM), mientras que en presencia de concentraciones bajas de fructosa no observamos inhibición de la respiración celular. Sin embargo, en presencia de concentraciones mayores de ambas hexosas (arriba de 1mM) la respiración celular se abatió completamente. La inhibición de la respiración celular en presencia de ambas hexosas nos sugiere varias hipótesis: (1) el exceso de glucosa, al ser continuamente fosforilada, puede disminuir los niveles de fosfato intracelular, provocando una baja disponibilidad del metabolito para la mitocondria, o bien (2) según la hipótesis de Evtodienko y cols. [37,38], la glucosa modifica el contenido de Ca^{2+} intracelular. En el caso de las concentraciones bajas de glucosa, la recuperación de la respiración puede deberse a la rápida utilización de la glucosa exógena por las células tumorales, por lo que sólo se da una inhibición parcial, mientras que posiblemente la fructosa, a estas concentraciones, no sea utilizada por las células tumorales.

De las hipótesis anteriores, la de Evtodienko y cols. [37,38] sugiere una estrecha relación entre el metabolismo glucolítico y la elevación en la concentración de Ca^{2+} citosólica. Para dilucidar si efectivamente este es el mecanismo de inhibición de la respiración celular, cuantificamos la concentración de Ca^{2+} libre citosólico en células tumorales, en presencia de diferentes fuentes de carbono, incluida la glucosa y fructosa. Encontramos que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se incrementa a través del tiempo, independientemente de la fuente de carbono externa, sugiriéndonos que tal elevación de Ca^{2+} citosólica no se debe a la presencia de la glucosa ni la fructosa. Estas concentraciones citosólicas de Ca^{2+} alcanzadas en las células AS-30D no son las que dañan el sistema fosforilante de la mitocondria [41], como argumenta Evtodienko y cols. en células de Ehrlich. Por lo anterior, el Ca^{2+} podría no ser el causante de la inhibición respiratoria. De hecho, las concentraciones de Ca^{2+} que determinamos a través del tiempo son las que estimulan a dos de las tres deshidrogenasas del ciclo de

Krebs tumoral: la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa [25,26].

Si bien es cierto que la glucosa inhibe la respiración celular a cualquier concentración (desde 0.1 mM) (Figura 5-A), también es cierto que en presencia de ella se suscita un incremento en el porcentaje de NAD(P)H citosólico (Figura 6), lo cual puede incrementar, por desplazamiento de masas a través del sistema aspartato/malato, el nivel del NAD(P)H mitocondrial, sustrato del Sitio I de la cadena respiratoria. Por otro lado, al incubar a las células en presencia de oligomicina, se obtuvo un porcentaje mayor de piridín nucleótidos reducidos, lo cual indica que la diferencia entre estos porcentajes (alrededor del 30%) es exclusivamente NADH utilizado para la fosforilación oxidativa.

Por tanto, se puede concluir que los factores causantes de la inhibición de la respiración no son ni el Ca^{2+} ni la baja disponibilidad de piridín nucleótidos reducidos, al menos en las células tumorales AS-30D.

También se ha involucrado al Mg^{2+} en el mecanismo de la inhibición respiratoria por hexosas [31], ya que en presencia de glucosa se observa una salida masiva del Mg^{2+} de la mitocondria. La inhibición respiratoria se produciría porque las enzimas de las reacciones que involucran la oxidación de sustratos en ciclo de Krebs requieren del Mg^{2+} como cofactor (por ejemplo, la α -cetoglutarato deshidrogenasa mitocondrial) [104,105]. Aunado a lo anterior, hay que considerar que el sustrato de la ATP sintetasa es ADP-Mg, por lo que, una disminución en la $[Mg^{2+}]$ mitocondrial provocaría una disminución en el sustrato de la ATP sintetasa y en la actividad de las deshidrogenasas, lo cual acarrearía una disminución drástica de la velocidad de fosforilación oxidativa, con la concomitante inhibición de la respiración celular.

Desafortunadamente, el punto anterior no pudo ser evaluado, debido a que en nuestras condiciones no se logró determinar, con precisión, la concentración de Mg^{2+} intracelular, por lo que no sabemos si existen variaciones en la $[Mg^{2+}]_c$.

1.8 Efecto de los diferentes inhibidores de la salida de Ca^{2+} mitocondrial y de retículo endoplásmico en células AS-30D.

Para dilucidar la procedencia del Ca^{2+} citoplasmático en las células tumorales AS-30D se llevaron a cabo experimentos en donde se inhibió la salida del Ca^{2+} de la mitocondria y del retículo endoplásmico. Nuestra hipótesis es que si el Ca^{2+} provenía

de reservorios intracelulares, como la mitocondria o el retículo endoplásmico, al inhibir la salida del catión al citoplasma no se observaría el cambio en la $[Ca^{2+}]_c$ durante los tiempos evaluados. A pesar de utilizar concentraciones saturantes de oligomicina o del desacoplante CCCP, obtuvimos un incremento en la $[Ca^{2+}]_c$, igual que en la condición control (células sin oligomicina ni CCCP). Lo anterior claramente indica que el Ca^{2+} no proviene de la mitocondria.

El paso siguiente fue realizar el estudio en presencia de bloqueadores de los receptores del retículo endoplásmico y de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. No existen reportes en la literatura acerca de la existencia de receptores sensibles a ATP o receptores sensibles a Ca^{2+} (*calcium induced, calcium release*) en células tumorales, sólo se conoce la existencia de aquellos sensibles a inositol trifosfato en el retículo endoplásmico [34]. Sin embargo, a pesar de utilizar concentraciones que inhiben a los receptores en otros tejidos [89], no observamos diferencia entre los experimentos control y los experimentos con inhibidores. Por tanto, es probable que en este tipo celular tumoral, los receptores son insensibles a las concentraciones utilizadas, o bien que no existen tales receptores en el retículo endoplásmico de célula tumoral AS-30D.

1.9 Efecto de los inhibidores de la entrada de Ca^{2+} extracelular

En presencia de EGTA 2mM observamos que la concentración de Ca^{2+} intracelular no se modifica en un intervalos de 40 minutos, lo que sugiere que el Ca^{2+} podría provenir del medio extracelular. Lo anterior fue corroborado al no encontrar cambio en la $[Ca^{2+}]_c$ en un medio carente de Ca^{2+} . Por tanto, supusimos que si se bloqueaba la entrada de Ca^{2+} extracelular al interior de la célula con verapamil (inhibidor de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje) encontraríamos una situación similar a la encontrada con EGTA. Sin embargo, seguimos observando un incremento del Ca^{2+} citoplásmático, lo que sugiere (1) la inexistencia de estos receptores en células AS-30D, (2) el acceso del Ca^{2+} al interior de la célula se realiza por otro mecanismo insensible a estos inhibidores ó (3) los receptores han perdido su sensibilidad a estos compuestos.

CAPITULO VI

1. Conclusiones.

1. Hemos encontrado que a pesar de que las células tumorales AS-30D presentan una acelerada velocidad glucolítica (incremento en el consumo de glucosa y evidente acumulación de ácido láctico), también mantienen una fosforilación oxidativa muy activa: la alta concentración de O_2 presente en el líquido de hepatoma sugiere una fuerte dependencia de las células al metabolismo oxidativo. Esta aseveración está sostenida por el hecho de encontrar una actividad respiratoria bastante acelerada en este tipo tumoral. La baja concentración de glucosa encontrada en líquido de ascitis no ejerce acción inhibitoria de la respiración.
2. El Sitio I de la cadena respiratoria (la NADH ubiquinol oxidoreductasa) es la enzima que controla el flujo metabólico en la fosforilación oxidativa, cuando las vías glucolítica y cetolítica están activas. Al respecto, debe de considerarse que el 60% del NAD(P)H es utilizado para la síntesis del ATP, además de considerar que la baja disponibilidad inicial del NADH desaparece por un posible aumento en la actividad de las deshidrogenasas.
3. La glucólisis, la glucogenólisis, la degradación de cuerpos cetónicos, la degradación de glutamato y la fosforilación oxidativa son las vías catabólicas más activas durante la fase de proliferación celular en las células AS-30D.
4. La alta actividad glucolítica en presencia de O_2 sugiere fuertemente que las enzimas involucradas en el control de la glucólisis, y responsables del efecto Pasteur, muestran un comportamiento atípico.
5. La inhibición de la respiración celular por glucosa exógena (efecto Crabtree) se observó sólo a concentraciones altas de la hexosa ($>0.1mM$). El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ registrado en las células tumorales AS-30D, en presencia y ausencia de glucosa, se encuentra en el intervalo en el cual existe activación de las deshidrogenasas. Por tanto, concluimos que el Ca^{2+} no parece ser el causante del efecto Crabtree.

2. Perspectivas

Esta tesis enfatiza la relevancia de la fosforilación oxidativa en el suministro de ATP en las células que, desde hace varias décadas, han sido consideradas exclusivamente glucolíticas. Se están realizando los primeros experimentos que permitirán, utilizando la teoría moderna de control metabólico, dilucidar a la enzima o enzimas que controlan, en condiciones cercanas a las fisiológicas, la velocidad de flujo de la vía. Una vez conocidas las enzimas reguladoras, se podría manipular a la vía, utilizando el inhibidor específico para ella y, de esta manera, en condiciones experimentales, bloquear su actividad. Si suponemos que la duplicación celular depende del suministro de ATP que proviene tanto de la vía glucolítica como de la fosforilación oxidativa. Por ello, la disminución del crecimiento del tumor inducido por la inhibición de la fosforilación oxidativa puede depender del grado de participación que tenga su metabolismo oxidativo.

Debido a que hemos observado que el efecto Pasteur es inexistente en las células tumorales y la enzima fosfofructocinasa I (PFK-I) está involucrada en tal efecto, sería interesante medir el efecto de moduladores importantes, como el citrato, la $[H^+]$, el P_i y los adenín nucleótidos, sobre la enzima aislada. Estos resultados podrían ayudarnos a predecir si el comportamiento atípico de esta enzima está relacionado con la resistencia a la radioterapia.

Por otro lado, existen varios reportes que demuestran que las células tumorales son capaces de consumir a la glutamina exógena y, al mismo tiempo, producir grandes cantidades de ácido láctico [2], por una serie de reacciones similares a las encontradas en la vía de la gluconeogénesis normal; sin embargo, en vez de que el fosfoenolpiruvato forme glucosa, como sucede en condiciones normales, es transformado a ácido láctico, lo que sugiere que la piruvato cinasa continúa activa, permitiendo la transformación de fosfoenolpiruvato a lactato. Esta enzima, que también es limitante en la vía glucolítica no se ha estudiado en células tumorales.

Asumiendo que el Ca^{2+} activa a las deshidrogenasas mitocondriales, sería interesante determinar la concentración intramitocondrial de calcio, en las condiciones en las que se observa el efecto Crabtree, para correlacionarlo con el metabolismo atípico de este tipo de células. Un dato interesante que se obtuvo en este trabajo es que, a pesar de que la concentración de glucosa en sangre de rata con hepatoma oscila entre 2-4 mM, la glucosa encontrada en el líquido de ascitis no rebasa los 50 μM .

Posiblemente el transporte de glucosa de los capilares sanguíneos al interior de la célula es muy rápido, evitando la detección de glucosa en el líquido ascítico; por tanto, sería interesante determinar la participación del transportador de glucosa en este tipo tumoral. Además, nuestros datos parecen apuntar a que la fosforilación oxidativa está modulada por la glucosa y podría depender de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ y, por ende, depender de la $[Ca^{2+}]_m$.

Se ha demostrado, en las mitocondrias de células tumorales [25,26], que el Ca^{2+} modula la fosforilación oxidativa, activando a las deshidrogenasas del ciclo de Krebs. En las mitocondrias de hígado de rata, el Ca^{2+} participa activando directamente a otras enzimas de la fosforilación oxidativa (como la translocasa de adenín nucleótidos y la ATP sintetasa) [103]. Entonces, se podría proponer que el Ca^{2+} estimula a la fosforilación oxidativa en las mitocondrias tumorales en donde el ciclo de Krebs se encuentra "truncado" (como Ehrlich y Ehrlich Letrecé), por lo que siempre habrá un suministro de ATP, debido a la frecuente activación de la vía por Ca^{2+} a un nivel diferente de las deshidrogenasas mitocondriales.

Así como el Ca^{2+} , el Mg^{2+} también es un buen candidato de estudio en células tumorales debido a que (1) está relacionado con el efecto Crabtree, (2) participa como activador de reacciones acopladas a la síntesis de ATP y (3) interviene en reacciones de división celular. Al respecto, es importante determinar el flujo de Mg^{2+} a través de la membrana plasmática y medir los gradientes de Mg^{2+} tanto en el citosol como en la mitocondria para correlacionarlo con la actividad de la vía de fosforilación oxidativa.

La manipulación del metabolismo glucolítico de la célula tumoral, induciendo una transformación hacia un metabolismo oxidativo, basándonos en la hipótesis de Acker y Görlach [45], podría aumentar la sensibilidad de las células cancerígenas a la radioterapia: utilizando inhibidores específicos de la glucólisis (oxamato ó gopipol) o drogas que afectan otras vías metabólicas como el 3-mercaptopicolinato (gluconecogénesis), para forzar a la célula a que utilice de forma predominante a la fosforilación oxidativa. El enfoque anterior, desde el punto de vista clínico, es de interés, ya que se podrán sensibilizar a las células tumorales a los procedimientos radioterapéuticos, para disminuir el crecimiento celular y por tanto el desarrollo del tumor.

3. Bibliografia.

1. Federsen PL. (1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of Cancer Cells. *Prog exp Tumor Res.* 22,190.
2. Eigenbrodt E, Fister P, Reinacher M. (1984). In Regulation of Carbohydrate Metabolism: New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells. Feitner R. Boca Raton FL: CRC Press. 6,141.
3. Dietzen DJ, Davis J. (1993). Oxidation of pyruvate, malate, citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 305,91.
4. Parlo RA, Coleman PS. (1986). Continuous pyruvate carbon flux to newly synthesized cholesterol and the suppressed evolution of pyruvate-generated CO₂ in tumors: further evidence for a persistent truncated Krebs cycle in hepatomas. *Biochem Biophys Acta.* 886,169.
5. Bustamante E, Federsen PL. (1977). High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci.* 74, 3735.
6. Argilés JM, López-Soriano FJ. (1991). The energy state of tumor-bearing rats. *J Biol Chem.* 266,2978.
7. Davis SE, Brindle KM. (1992). Effects of overexpression of phosphofructokinase on glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.* 31,4729.
8. Stubbs M, Rodrigues L, Howe FA, Wang J, Jeong K, Veech RL, Griffiths JR. (1994). Metabolic consequences of a reversed pH gradient in rat tumors. *Cancer Res.* 54,4011.
9. Boxer GE, Devlin TM. (1961). Pathways of intracellular hydrogen transport. *Science.* 134,1493.
10. Grivell AR, Korpelainen EI, Williams CJ, Berry MN. (1995). Substrate-dependent utilization of the glycerol 3-phosphate or malate/aspartate redox shuttles by Ehrlich ascites cells. *Biochem J.* 310,665.
11. Baggeto LG, Lehninger AL. (1987). Formation and utilization of Acetoin, an unusual product of pyruvate metabolism by Ehrlich and AS-30D tumor mitochondria. *J Biol Chem.* 262,9535.
12. Baggeto LG, Testa-Parussini R. (1990). Role of acetoin on the regulation of intermediate metabolism of Ehrlich ascites tumor mitochondria: Its contribution to membrane cholesterol enrichment modifying passive proton permeability. *Arch Biochem Biophys.* 283, 241.
13. Baggeto LG. (1992). Desviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimic.* 74, 959.

14. LaNoue K, Schoolwerth A. (1979). Metabolite transport in mitochondria. *Ann Rev Biochem.* 48, 871.
15. Lazo A, Sols A. (1980). Pyruvate dehydrogenase complex of ascites tumour. *Biochem J.* 190, 703.
16. Briacoe DA, Fiskum G, Holleran AL, Kelleher JK. (1994). Acetoacetate metabolism in A3-SOD hepatoma cells. *Mol Cell Biochem.* 156, 131.
17. Ohe K, Morris HP, Weinhouse S. (1967). D- β -Hydroxybutyrate dehydrogenase activity in liver an tumor. *Cancer Res.* 27, 1360.
18. Dietzen DJ, Davis EJ. (1994). Excess membrane cholesterol is not responsible for metabolic and bioenergetic changes in A3-SOD hepatoma mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 309, 341.
19. Ding JL, Smith GD, Peters TJ. (1981). Subcellular localization and isolation of γ -glutamyltransferase from rat hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 661, 191.
20. Molina M, Segura JA, Aledo JC, Medina MA, Núñez de Castro I, Márquez J. (1995). Glutamine transport by vesicles isolated from tumour-cell mitochondrial inner membrane. *Biochem J.* 308, 629.
21. Lazo PA. (1981). Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in Ascites-Tumour Cells. *Eur J Biochem.* 117, 19.
22. Corvera S, García-Sainz JA. (1983). Hormonal stimulation of mitochondrial glutaminase. *Biochem J.* 210, 957.
23. Moreadith RA, Lehninger AL. (1984). Purification, kinetic behavior, and regulation of NAD(P)⁺ Malic enzyme of tumor mitochondria. *J Biol Chem.* 259, 6222.
24. Moreno-Sánchez R, Hogue BA, Hansford R. (1990). Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *Biochem J.* 268, 421.
25. Murphy AN, Kelleher JK, Fiskum G. (1988). Calcium sensitive Isocitrate and 2-oxoglutarate dehydrogenase activities in rat liver and A3-SOD hepatoma mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 157, 1218.
26. Murphy AN, Kelleher JK, Fiskum G. (1990). Submicromolar Ca²⁺ regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and A3-SOD hepatoma mitochondria by different mechanism. *J Biol Chem.* 265, 10527.
27. Müller M, Siems W, Buttgerit F, Dumdey R, Rapoport SM. (1986). Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells. *Eur J Biochem.* 161, 701.
28. Schmidt H, Siems W, Müller M, Dumdey R, Rapoport SM. (1991). ATP-producing and consuming processes of Ehrlich mouse ascites tumor cells in proliferating and resting phases. *Exp Cell Res.* 194, 122.

29. Fearon KCH, Flumb JA, Burns HJG, Calman KC. (1987). Reduction of the growth rate of the Walker 256 tumor in rats by Rhodamine 6G together with hypoglycemia. *Cancer Res.* 47, 3624.
30. Jaroszewski JW, Kaplan O, Cohen JS. (1990). Action of Gossypol and Rhodamine 123 on wild type and multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cells: ^{31}P nuclear magnetic resonance and toxicity studies. *Cancer Res.* 50, 6996.
31. Sri-Pathmanathan RM, Flumb JA, Fearon KCH. (1994). Clofazimine alters the energy metabolism and inhibits the growth rate of a human lung-cancer cell line *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer.* 56, 900.
32. Wolf F, Di Francesco A, Cittadini A. (1994). Characterization of Magnesium efflux from Ehrlich ascites tumor cells. *Arch Biochem Biophys.* 308, 335.
33. DUBYAK GR, De Young MB. (1985). Intracellular Ca^{2+} mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich Ascites Tumor Cells. *J Biol Chem.* 260, 10653.
34. Torres-Márquez ME, Mejía S, Moreno-Sánchez R. (1993). Modulation of the ATP induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in A5-30D hepatoma cells. *Int J Biochem.* 25, 1109.
35. Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. (1991). Measurement of the cytosolic Ca^{2+} mobilization induced by extracellular ATP in A5-30D hepatoma cells using Indo-1. *Proc West Pharmacol Soc.* 34, 399.
36. Fleischer CR, Martin PA, Vorbeck ML, Darnold JR, Long JW. (1983). Ca^{2+} release from energetically coupled tumor mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 115, 430.
37. Evtodienko YV, Teplova VV, Duszynski J, Bogucka K, Wojtczak L. (1994). The role of cytoplasmatic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in glucose-induced inhibition of respiration and oxidative phosphorylation in Ehrlich ascites tumour cells: a novel mechanism of the Crabtree effect. *Cell Calcium.* 15, 439.
38. Teplova VV, Bogucka K, Czyz A, Evtodienko YV, Duszynski J, Wojtczak L. (1993). Effect of glucose and deoxyglucose on cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 196, 1148.
39. Moreno-Sánchez R, Torres-Márquez ME; López-Gómez EJ. (1993). La determinación de la concentración de calcio libre en células y mitocondrias con Indicadores Fluorescentes. *Ciencia.* 44, 383.
40. Bogucka K, Teplova VV, Wojtczak L, Evtodienko YV. (1995). Inhibition by Ca^{2+} of the hydrolysis and the synthesis of ATP in Ehrlich ascites tumour mitochondria: relation to the Crabtree effect. *Biochem Biophys Acta.* 1228, 261.
41. Moreno-Sánchez R. (1985). Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca^{2+} concentrations. *J Biol Chem.* 260, 4028.

42. Moreno-Sánchez R. (1989). Inhibition of oxidative phosphorylation by Ca^{2+} -induced diminution of the Adenine nucleotide translocator. *Biochim Biophys Acta.* 724, 278.
43. Tuena de Gómez-Puyou M, Gavilanes M, Gómez-Puyou A, Ernster L. (1980). Control of activity states of heart mitochondrial ATPase. Role of the proton-motive force and Ca^{2+} . *Biochim Biophys Acta.* 592, 396.
44. Eboli ML, Malmström K, Galeotti T, López-Alarcón L, Carafoli E. (1979). Calcium transport and translocation of adenine nucleotides in mitochondria from Morris hepatoma 3924A. *Cancer Res.* 39, 2737.
45. Görlach A, Acker H. (1994). pO_2 - and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1227, 105.
46. Moreno-Sánchez R, Torres-Márquez ME. (1991). Control of Oxidative phosphorylation in mitochondria, cells and tissues. *Int J Biochem.* 23, 1163.
47. Wanders RA, Groen AK, Van Roermund CWT, Tager J. (1984). Factors determining the relative contribution of the adenine-nucleotide translocator and the ADF-regenerating system to the control of oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria. *Eur J Biochem.* 142, 417.
48. López-Gómez FJ, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. (1993). Control of oxidative phosphorylation in AS-30D hepatoma mitochondria. *Int J Biochem.* 25, 373.
49. Lau BWC, Chan SHP. (1984). Efflux of adenine nucleotides in mitochondria from rat tumor cells of varying growth rates. *Cancer Res.* 44, 4458.
50. Segel IH. (1975). *Enzyme Kinetics.* John Wiley and sons. New York: 3.
51. Gellerich FN, Kunz WS, Bohnenack R. E. (1990). Estimation of flux control-coefficients from inhibitor titrations by non-linear regression. *FEBS.* 274, 167.
52. La Noue KF, Hemington JG, Ohnishi T, Morris HP, Williamson JR. (1974). Detects in anion and electron transport in Morris hepatoma mitochondria. In: *McKerns Hormones and Cancer.* Academic Press, NY. 131.
53. Howatson AF, Ham AW. (1955). Electron microscopy study of sections of two rat liver tumors. *Cancer Res.* 15, 62.
54. Pedersen PL. (1972). Enzymology, ultrastructure and energetics of mitochondria from three hepatoma of widely different growth rate. *Gann Monogr. Cancer Res.* 13, 251.
55. Márquez J. (1985). *Manual de prácticas 2. Lab citología Fac. Química, UNAM.* 33.
56. Gornall AG, David MM. (1949). *J Biol Chem.* 177, 751.

57. Bergmeyer HU. (1983). In *Methods of enzymatic analysis: Metabolites 2, Monosaccharides and derivatives.* 7, 178.
58. Bergmeyer HU. (1983). In *Methods of enzymatic analysis: Metabolites 1, Carbohydrates.* 6, 570.
59. Bergmeyer HU. (1974). In *Methods of enzymatic analysis: Metabolites, Carbohydrate metabolism.* 3, 1465.
60. Bergmeyer HU. (1983). In *Methods of enzymatic analysis: Proteins and peptides, amino acids and related compounds.* 9, 357.
61. Bergmeyer HU. (1983). In *Methods of enzymatic analysis: Proteins and peptides, amino acids and related compounds.* 9, 364.
62. Bergmeyer HU. (1983). In *Methods of enzymatic analysis: Lipids, drugs, pesticides.* 8, 60.
63. Bergmeyer HU. (1983). In *Methods of enzymatic analysis: Metabolites 1, Carbohydrates.* 6, 671.
64. Khym J. (1975). An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressures on conventional anion exchangers. *Clin Chem* 21, 1245.
65. Rottenberg H. (1979). The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. *Methods in enzymology* . 55, 547.
66. Tager JM, Groen AK, Wanders RJ, Duszynski J, Westerhoff HV, Vervoorn RC. (1983). Control of mitochondrial respiration. *Febs Letter.* 151, 1.
67. García C, Pardo JP, Moreno-Sánchez R. (1996). Control of Oxidative phosphorylation supported by NAD-linked substrates in rat brain mitochondria. *Bioch Arch.* 12, 157.
68. Lattanzio FA. (1990). The effects of pH and temperature on fluorescent calcium indicators as determined with Chelex-100 and EDTA buffer systems. *Biochem Biophys Res Commun.* 171, 102.
69. Rutter GA, Osbaldeston NJ, McCormack JG, Denton RM. (1990). Measurement of matrix free Mg^{2+} concentration in rat heart mitochondria by using entrapped fluorescent probes. 271, 627.
70. Jung DW, Chapman CJ, Baysal K, Pfeiffer DR, Brierley GP. (1996). On the use of fluorescent probes to estimate free Mg^{2+} in the matrix of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 332, 19.
71. London RE. (1991). Methods for measurement of intracellular magnesium: NMR and Fluorescence. *Annu Rev Physiol.* 53, 241.
72. Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, Cahill GF. (1969). Liver and Kidney Metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest.* 48, 574.

75. Salway JG. (1969). The simultaneous determination of acetoacetate and glucose in capillary blood. *Clin Chim Acta.* 25, 109.
74. Greenbaum AL, Gumas KA, McLean P. (1971). The distribution of hepatic metabolites and the control of the pathways of carbohydrate metabolism in animals of different dietary and hormonal status. *Arch Biochem Biophys.* 143, 617.
- 74A. Woods HF, Krebs HA. (1975). The effect of glycerol and dihydroxy acetone on hepatic adenine nucleotides. *Biochem J.* 132, 55.
75. Lanze U, Hanson RW. (1980). In *Principles of metabolic control in mammalian systems: Compartmentation and its role in metabolic regulation*. Plenum Press, New York. 15, 495.
76. Grunnet N. (1970). Oxidation of extramitochondrial NADH by rat liver mitochondria. Possible role of acyl-S-CoA elongation enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 41, 909.
77. Sies H, Graf F, Crane D. (1983). Decreased flux through pyruvate dehydrogenase during calcium ion movements induced by vasopressin, α -adrenergic agonists and the ionophore A 23187 in perfused rat liver. *Biochem J.* 212, 571.
78. Kashiwagura T, Deutch CJ, Taylor J, Erecinaka M, Wilson DF. (1984). Dependence of gluconeogenesis, urea synthesis and energy metabolism of hepatocytes on intracellular pH. *J Biol Chem.* 237.
79. López-Gómez FJ. (1992). En: *Control de la fosforilación oxidativa y transporte de Ca^{2+} en mitocondrias de mamífero.* 107, Tesis UNAM, México.
80. Groen AK, Wanders RJA, Westeijhoff HV, Vander Meer R, Tager JM. (1982). Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biol Chem.* 257, 2754.
81. Stubbs M, Vignais PV, Krebs HA. (1978) *Biochem J.* 172, 332.
82. Crabtree HG. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J.* 23, 536.
83. Ibsen KH. (1961). The Crabtree effect: a review. *Cancer Res.* 21, 829.
84. Smith JS, Coronado R, Meissner G. (1985). Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels. *Nature.* 316, 446.
85. Sagara Y, Fernández-Belda F, De Meis L. (1992). Characterization of the inhibition of intracellular Ca^{2+} transport ATPases by thapsigargin. *J Biol Chem.* 267, 12606.
86. Berridge MJ. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361, 315.

87. Campbell KP. (1987). Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem.* 262, 16636.
88. Ward A, Chaffman MO, Sorkin EM. (1986). Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. *Drugs.* 32, 130.
89. Moreno-Sánchez R, Hansford RG. (1991). Inhibition of the veratridine-induced increase in cytosolic Ca^{2+} and respiration by Ca^{2+} antagonist in isolated cardiac myocytes. *Int J Biochem.* 23, 889.
90. Hofer AM, Schulz I. (1996). Quantification of intraluminal free [Ca] in the agonist-sensitive internal calcium store using compartmentalized fluorescent indicators: some considerations. *Cell Calcium.* 20, 235.
91. Fenselau A, Wallis K, Morris HP. (1975). AcAc coenzyme A transferase activity in rat hepatomas. *Cancer Res.* 35, 2315.
92. Brand MD, Murphy MP. (1987). Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol Rev.* 62, 141.
93. Ferreira J. (1992). The oxygen dependence of the mitochondrial respiration rate in ascites tumor cells. *Eur J Biochem.* 207, 857.
94. Nauck M, Wolf D, Kats N. (1981). Modulation of the glucagon-dependent induction of PEP carboxylase and tyrosine in arterial and venous $[O_2]$ hepatocytes cultures. *Eur J Biochem.* 119, 657.
95. Jungermann K, Katz N. (1982). Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology.* 2, 285.
96. Hensgens LAM, Nieuwenhuis BJWM, Vander Meer R. (1980). The role of hydrogen translocating shuttles during ethanol oxidation in hepatocytes from euthyroid and hyperthyroid rats. *Eur J Biochem.* 108, 439.
97. Schwartz JF, Passonneau JV, Johnson GS, Pastan J. (1979). The effect of growth conditions on NAD^+ and NADH concentrations and the $NAD^+/NADH$ ratio in normal and transformed fibroblast. *J Biol Chem.* 249, 4138.
98. Koretsky AP, Balaban RS. (1987). Changes in pyridine nucleotides levels alter oxygen consumption and extra-mitochondrial phosphates in isolated mitochondria: a ^{31}P -NMR and NAD(PH) fluorescence study. *Bioch Biophys Acta.* 893, 398.
99. Kacser H, Burns JA. (1979). Molecular democracy: Who shares the controls?. *Biochem Soc Trans.* 7, 1149.
100. Heinrich R, Rapoport TA. (1974). A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur J Biochem.* 42, 89.

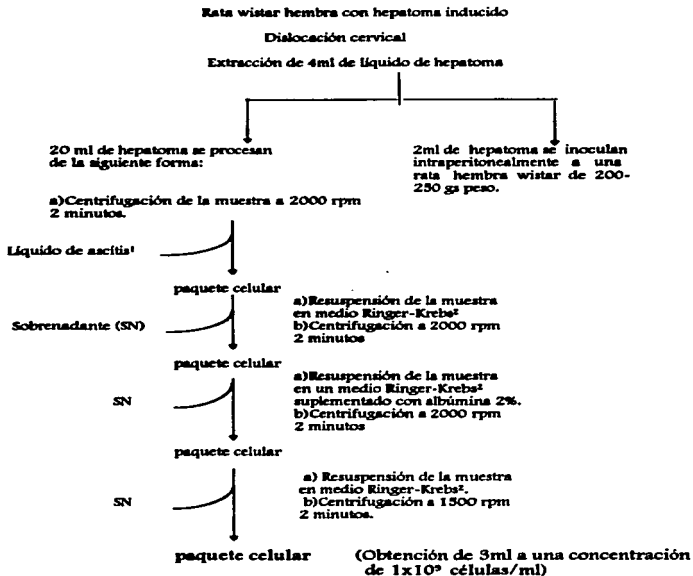
101. Brown GC, Lakin-Thomas FL, Brand MD. (1990). Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. FEBS. 192, 355.
102. Moreno-Sánchez R, Devars S, López-Gómez F, Uribe A, Corona N. (1991). Distribution of control of oxidative phosphorylation in mitochondria oxidizing NAD-linked substrates. Biochim Biophys Acta. 1060, 284.
103. Moreno-Sánchez R. (1985). Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. J Biol Chem. 260, 12554.
104. Panov S, Scarpa A. (1996). Independent modulation of the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase complex by Ca^{2+} and Mg^{2+} . Biochem. 35, 427.
105. Rodríguez-Zavala JS, Moreno-Sánchez R. Modulation of oxidative phosphorylation by Mg^{2+} in rat heart mitochondria (en preparación).

APPENDICE

Apéndice A

Aislamiento de las células del hepatoma AS-30D.

Diagrama de flujo que muestra el proceso de aislamiento de las células del hepatoma AS-30D:



Líquido de ascitis¹.- Fracción libre de células (este líquido se conserva en hielo para la determinación de metabolitos)

Ringer-Krebs².- Medio estándar que contiene 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 25mM HEPES, 1.4mM CaCl₂, 1mM H₂PO₄, 1mM MgCl₂, pH 7.4 con KOH.

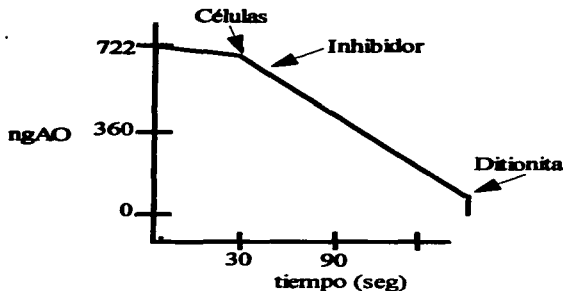
Apéndice B

Medición de la respiración celular absoluta en las células del hepatoma AS-SOD.

La respiración celular absoluta es aquella que involucra tanto a la respiración mitocondrial como a la no mitocondrial. Para determinarla, se utilizó un oxímetro y un electrodo de oxígeno tipo Clark. 10⁶ células/ml fueron adicionadas a 1.9 ml del medio de Ringer Krebs modificado, saturado con aire, a 37°C, como se muestra en la siguiente figura:

La solubilidad del O₂ en el medio Ringer-Krebs, a 37°C, y a la altitud de la ciudad de México (2240 mts sobre el nivel del mar) se calculó en 380 ngAO/ml. Por tanto, al emplearse 1.9 ml del medio se tiene un valor de 722 ngAO totales. Los diferentes inhibidores fueron adicionados a los 10 seg. después de ser añadidas las células en la cámara, a las concentraciones ya mencionadas en Métodos.

Para obtener la mínima concentración de oxígeno en el medio, se agregó ditionita.



Apéndice C

Determinación de las relaciones NADH/NAD citosólicas y mitocondriales de AS-SOD

a) Relación NADH/NAD citosólica:



Por tanto

$$\frac{NADH}{NAD} = \frac{[\text{lactato}]}{[\text{piruvato}]} Keq,$$

$$\text{donde } Keq = 1.11 \times 10^{-4} M$$

b) Relación NADH/NAD mitocondrial:



Por tanto

$$\frac{NADH}{NAD} = \frac{[\beta\text{-OHbutirato}]}{[\text{Acetoacetato}]} Keq$$

$$\text{donde } Keq = 0.049 M$$