

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DEL
TRANSPORTADOR DE GLUCOSA EN LA
LÍNEA TUMORAL AS-30D”**

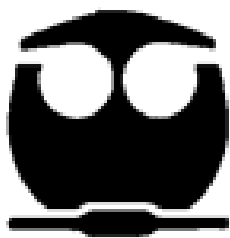
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

FANNY LESLIE FLORES RODRÍGUEZ



MÉXICO, D. F

2008



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.

Jurado asignado

Presidente	Homero Hernández Montes
Vocal	Irma Bernal Lugo
Secretario	Sara Rodríguez Enríquez
1^{er} Suplente	Criselda Mendoza Milla
2^{do} Suplente	Gloria Gutiérrez Venegas

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Departamento de Bioquímica.

Asesor:

Dra. Sara Rodríguez Enríquez

Sustentante:

Fanny Leslie Flores Rodríguez

Agradecimientos:

A Dios por permitirme llegar con éxito a esta etapa de mi vida.

A mis Padres por creer en mi y por brindarme todo su apoyo y amor incondicional, éste sueño es parte de ustedes.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por abrirme las puertas a mi educación profesional.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y al Departamento de Bioquímica por permitirme ser parte de éste exitoso grupo de trabajo.

A los Doctores Rafael Moreno y Álvaro Marín por las valiosas aportaciones y atenciones que me brindaron durante el desarrollo de este proyecto.

A Sergio, gracias por todo el amor, comprensión, paciencia y apoyo incondicional que me has brindado durante todo este tiempo, el que éste sueño sea hoy una realidad es en gran parte gracias a ti.

A mis mejores amigos y a todas aquellas personas que estuvieron a mi lado durante esta etapa de mi vida compartiendo conmigo momentos felices y apoyándome siempre que lo necesité.

La gratitud es la memoria del corazón...

“Hay que aprender a hacer de la vida un sueño y de los sueños una realidad”

Pierre Curie

Contenido

ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Transporte de glucosa en células de mamífero	9
1.2. Mecanismo de transporte de glucosa a través de GLUT.....	12
1.3. Transporte de glucosa en células tumorales.....	14
1.4. Caracterización cinética del transporte de glucosa.....	17
<i>1.4.1. Definición de las constantes cinéticas</i>	<i>17</i>
<i>1.4.2. Inhibición enzimática.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.3. Método de Dixon</i>	<i>22</i>
1.5. Caracterización del transporte de glucosa en células normales y en células tumorales	22
1.6. Inhibidores del transporte de glucosa.....	27
<i>1.6.1. Citocalasina B</i>	<i>27</i>
<i>1.6.2. Floretina</i>	<i>29</i>
1.7. Estimulación del transporte de glucosa.....	31
<i>1.7.1. Efecto de la insulina</i>	<i>31</i>
1.8. Análisis del control metabólico de la glucólisis en células tumorales	33
1.9. Teoría del análisis del control metabólico	36
<i>1.9.1. Sitios de control en una vía metabólica</i>	<i>36</i>
<i>1.9.2. Control de la glucólisis en la línea tumoral AS-30D.....</i>	<i>38</i>
2. HIPÓTESIS	41
3. OBJETIVO GENERAL	41
4. OBJETIVOS PARTICULARES	41
5. METODOLOGÍA	42

5.1. Propagación y obtención de células AS-30D.....	42
5.2. Purificación y cuantificación de células AS-30D.....	42
5.3. Preparación de extractos celulares.	42
5.4. Determinación de actividades enzimáticas.....	43
5.4.1. <i>Actividad de HK en extractos celulares</i>	<i>43</i>
5.4.2. <i>Actividad de HK en la fracción mitocondrial</i>	<i>43</i>
5.5. Determinación de velocidad de glucólisis a 15 y 37°C	44
5.6. Cuantificación de metabolitos	44
5.6.1. <i>Glucosa-6-fosfato.....</i>	<i>44</i>
5.6.2. <i>L-lactato.....</i>	<i>45</i>
5.7. Preparación del stock de glucosa con marca radiactiva y preparación del stock de inhibidor.	45
5.8. Determinación de la actividad de GLUT	46
5.9. Ensayos de inhibición y K_i sobre la actividad de GLUT.	47
5.10. Determinación de actividad de GLUT en presencia de insulina	48
5.11. Determinación de actividad de GLUT en presencia de fructosa	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1. Implementación de la técnica experimental para la evaluación de la actividad de GLUT.....	49
6.1.1. <i>Sistema de filtrado y lavado de células: elección de membranas.....</i>	<i>49</i>
6.1.2. <i>Concentración de proteína celular necesaria para el ensayo de transporte</i>	<i>49</i>
6.1.3. <i>Selección de las condiciones para determinar la velocidad inicial del transporte de glucosa.....</i>	<i>51</i>
a) <i>Temperatura de reacción e inactivación de la HK.....</i>	<i>51</i>
b) <i>Temperatura de reacción y disminución de la velocidad de glucólisis...</i>	<i>53</i>
6.1.4. <i>Selección del tiempo de reacción</i>	<i>54</i>
6.2. Evaluación de la actividad de GLUT: determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_m.....	55
6.4. Sensibilidad del transporte de glucosa a inhibidores de GLUT	61

6.5. Citocalasina B.....	61
6.6. Floretina	66
6.7. Efecto de la insulina sobre el transporte de glucosa.....	68
6.8. Competencia del transporte de glucosa por fructosa	70
6.9. Extensión del estudio de actividad de GLUT en otras líneas tumorales de interés clínico: HeLa.....	71
6.9.1 <i>Cinética de transporte de glucosa en células HeLa.....</i>	71
6.9.2. <i>Sensibilidad de GLUT a citocalasina B en células HeLa.....</i>	73
6.9.3. <i>Identificación de las isoformas de GLUT presentes en el hepatoma AS-30D y en las células HeLa</i>	74
7. DISCUSIÓN GENERAL.....	77
8. CONCLUSIONES	89
9. BIBLIOGRAFÍA	91
APENDICE	102
<i>Apéndice 1. Participación en los artículos publicados previos a la presente Tesis.</i>	102

ABREVIATURAS

Lac	Ácido láctico
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina Sérica de Bovino (por sus siglas en inglés Bovine Serum Albumin)
ALD	Aldolasa
1,3BPG	1,3-bifosfoglicerato
CTRC	Células tumorales de rápido crecimiento
CB	Citocalasina B
IC_{50}	Concentración del inhibidor con la cual se inhibe el transporte de glucosa al 50%.
K_m	Constante de afinidad de Michaelis Menten
K_i	Constante de inhibición
CPM	Cuentas por minuto (registro de decaimiento radiactivo)
2-DOG	2-desoxiglucosa
6-DOG	6-desoxiglucosa
DE	Desviación estándar
DVPP	Difluoruro de polivinilo
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
ENO	Enolasa
18-FDG	18-flourodesoxiglucosa
P _i	Fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK-1	Fosfofructocinasa tipo 1
2PG	2-fosfoglicerato
3PG	3-fosfoglicerato

PGK	Fosfoglicerato cinasa
PGM	Fosfoglicerato mutasa
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
FO	Fosforilación oxidativa
F1,6BP	Fructosa-1,6-bifosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HK	Hexocinasa
HPI	Hexosa fosfato isomerasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (estado oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (estado reducido)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (estado oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (estado reducido)
3-OMG	3-oxígeno-metil-D-glucosa
Pyr	Piruvato
PYK	Piruvato cinasa
PET	Tomografía de emisión de positrones (por sus siglas en inglés, Positron Emission Tomography)
GLUT	Transportador de glucosa
TPI	Triosa fosfato isomerasa
H ³	Tritio
V _m	Velocidad máxima

RESUMEN

La velocidad de glucólisis en células tumorales de rápido crecimiento es mayor (de 2 a 50 veces) en comparación con células normales. Este fenómeno se explica, en parte, por la activación de oncogenes como *c-myc* y *h-ras*, y por la expresión del factor inducible por hipoxia HIF-1 α , los cuales aumentan la expresión y en consecuencia la cantidad de las enzimas involucradas en la vía glucolítica. En el hepatoma ascítico AS-30D determinamos que la velocidad de glucólisis es 10 veces mayor comparada con el hepatocito y además la distribución del control de flujo de la vía glucolítica está modificado, ya que el bloque enzimático formado por el transportador de glucosa (GLUT) y la hexocinasa (HK) controla el 71% del flujo total de la vía, aunque no se ha determinado cual es el aporte individual de cada proteína. Por ello, con el objetivo de determinar la contribución individual del GLUT sobre el control de la vía glucolítica realizamos la caracterización cinética del transportador de glucosa en células aisladas de AS-30D.

Para lo anterior se diseñó un protocolo experimental para medir el transporte de glucosa en condiciones de velocidad inicial, ya que de esta forma la velocidad determinada para el GLUT no se ve afectada por la catálisis que presenta la glucosa por parte del resto de las enzimas de la vía glucolítica. Las aproximaciones experimentales para la determinación de la velocidad de GLUT descritas en la literatura hasta la fecha no habían contemplado esta condición. Las principales limitantes de dichas aproximaciones son: 1) el empleo de análogos de glucosa (2-DOG y 3-OMG) contemplando que la afinidad de GLUT por estos análogos es la misma que por la glucosa; 2) la consideración de que dichos análogos no son fosforilados por la HK, y 3) la determinación de la actividad de GLUT medida a tiempos largos (hasta 10 min). Lo anterior solo permite obtener una velocidad estimada del transporte de glucosa.

Determinamos que temperaturas de 15 y 25 °C, así como un tiempo de incubación de 15 a 30 segundos son las condiciones óptimas para la determinación de la velocidad de transporte de glucosa en velocidad inicial. El diseño experimental contempló una estrategia para disminuir la actividad de la HK tumoral, la cual consume la glucosa exógena a altas velocidades. Al evaluar la cinética de transporte de glucosa a concentraciones crecientes del carbohidrato (0-40 mM) se observaron dos componentes; el primero de 0-10 mM de glucosa definió un comportamiento hiperbólico, mientras que el segundo de 10-40 mM presentó un comportamiento lineal. Estos resultados sugirieron la participación de la isoforma GLUT1 para el primer componente y la participación de una segunda isoforma de GLUT o bien el efecto sobre la fluidez de la membrana celular de las altas concentraciones de glucosa ensayadas para el segundo componente.

Los resultados de la determinación del transporte de glucosa se validaron al evaluar el efecto de algunos activadores e inhibidores del transporte de glucosa: los inhibidores citocalasina B y floretina inhibieron parcialmente el transporte de glucosa a 15 °C y a 25 °C y el análisis de Cornish-Bowden para la citocalasina B reveló un tipo de inhibición competitivo a ambas temperaturas (los valores determinados de K_i para citocalasina B se encontraron en los rangos reportados para GLUT1 en eritrocito); además, determinamos que la actividad de GLUT no se incrementa en presencia de insulina a concentraciones supra-fisiológicas y no se modifica por la presencia de otros sustratos como la fructosa.

Además, extendimos el análisis cinético del transporte de glucosa en la línea tumoral HeLa y determinamos que al igual que en AS-30D, concentraciones crecientes de glucosa revelan dos componentes sensibles a inhibidores como la citocalasina B. Sin embargo, en HeLa el componente lineal se hace presente a partir de 20 mM de glucosa a diferencia de AS-30D en donde el segundo componente se identifica a partir de 10 mM de glucosa; mas aún, la afinidad por glucosa del primer componente en AS-30D es mayor 2 órdenes de magnitud

que el primer componente identificado en HeLa. Esto se debe principalmente a las diferencias en el tipo de transportador de glucosa que posee cada célula. Por ello, en paralelo a la determinación de las constantes cinéticas identificamos las isoformas de GLUT presentes en cada línea tumoral por un análisis de Western Blot y los resultados mostraron que en el hepatoma AS-30D se expresa únicamente la isoforma GLUT 1, mientras que en las células HeLa se expresan GLUT 1 y GLUT 2.

El análisis de las propiedades cinéticas del transporte de glucosa en el hepatoma AS-30d a 35 °C obtenidas al calcular la Q_{10} de 15 a 25 °C reveló una V_m 21 veces menor a la V_m de la hexocinasa tumoral a 37 °C sugiriendo que éste puede ser potencialmente el principal sitio de control metabólico de la vía glucolítica en esta línea tumoral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Transporte de glucosa en células de mamífero

Uno de los sustratos más importantes para el metabolismo celular es la glucosa, que en el caso de mamíferos se obtiene de polisacáridos provenientes de la dieta. El proceso que involucra el transporte de la glucosa del exterior de la célula al citosol está mediado por proteínas integrales de membrana englobadas en dos grandes familias: los co-transportadores de glucosa dependientes de Na^+ y los transportadores por difusión facilitada de glucosa (GLUT) (Wood & Trayhurn, 2003).

Hasta el momento se han identificado 13 isoformas de GLUT (Joost & Thorens, 2001), que comparten las siguientes características estructurales y funcionales: a) presentan 12 dominios hidrofóbicos transmembranales que poseen su extremo N-amino y C-carboxilo orientados hacia el citosol (figura 1); b) la asparagina 45 presente en el dominio extracelular de unión de la hélices 1 y 2 está glicosilada (Asano, et al., 1991); c) poseen la capacidad de transportar otras hexosas como manosa, galactosa y fructosa con menor afinidad que la glucosa (Cunningham, Afzal-Ahmed & Naftalin, 2006) y d) la mayoría de las isoenzimas son tetrámeros en su forma funcional (Sultzman & Carruthers, 1999).

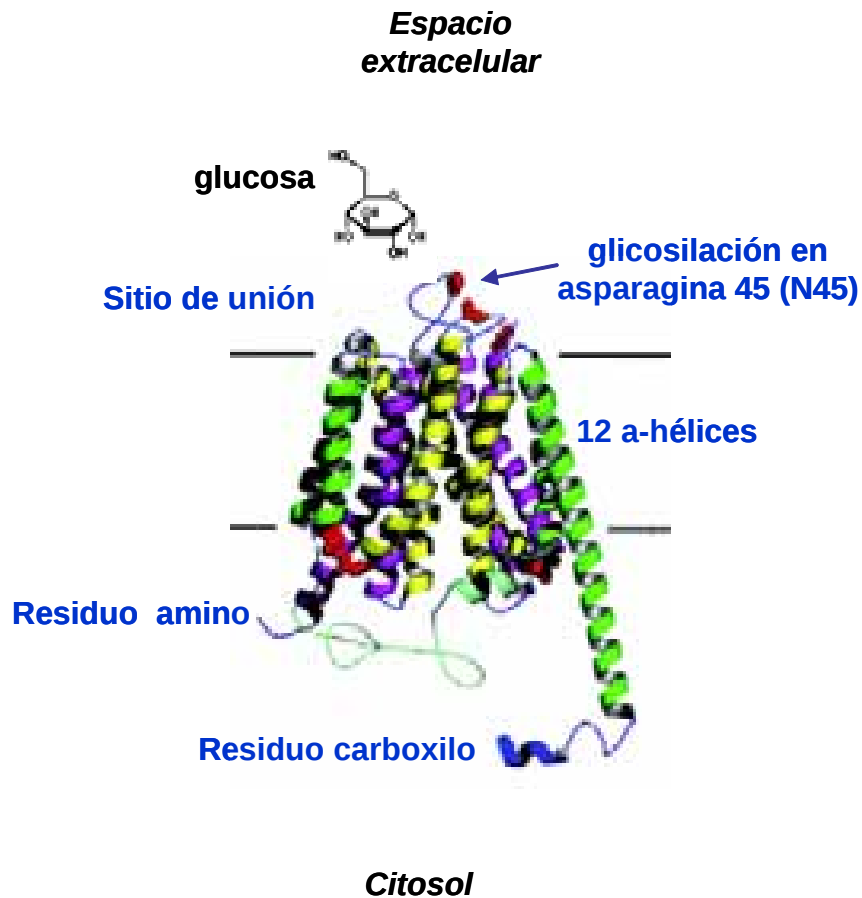


Figura 1. Representación de un monómero de GLUT1. Vista lateral de la posición relativa de las α -hélices embebidas en la membrana celular.

Las características cinéticas y la especificidad de sustrato para las diferentes isoformas de GLUT dependen del tipo de célula o tejido en el que se expresen y de sus requerimientos energéticos. En mamíferos, todas las células poseen uno o más miembros de GLUT, cuya función principal es mantener constante el suministro de glucosa para el metabolismo celular (Bell, et al., 1993). En la tabla 1 se mencionan las 7 isoformas de GLUT más importantes que se expresan en células de mamíferos.

Tabla 1. Principales isoformas de GLUT expresadas en células de mamíferos.

Isoforma	Expresión	Sustrato	Función
GLUT 1	En todos los tejidos; predominante en eritrocitos.	Glucosa	Transporte primario de glucosa.
GLUT 2	En hígado, células β pancreáticas, intestino delgado y riñón.	Glucosa	Transporte de glucosa con menor afinidad que GLUT 1 y mayor capacidad (trabajando en velocidad máxima)
GLUT 3	En cerebro, placenta y testículos.	Glucosa	Transporte primario de glucosa.
GLUT 4	En músculo esquelético, corazón y tejido adiposo.	Glucosa	Transporte de glucosa inducido por insulina.
GLUT 5	Predominante en intestino delgado, y escaso en riñón, músculo esquelético, tejido adiposo y cerebro.	Fructosa	Transporte primario de fructosa.
GLUT 7	En la fracción microsomal del hígado.	Fructosa	Transporte de fructosa.

1.2. Mecanismo de transporte de glucosa a través de GLUT

Los GLUT's pertenecen a una extensa familia de proteínas transportadoras cuyo mecanismo de transporte se conoce como de tipo E1-E2 (Stein, 1986); es decir, las subunidades catalíticas de la proteína presentan un ciclo entre dos estados conformacionales: la conformación E1 representa el sitio de unión con el ligando en el espacio extracelular, y la conformación E2 representa el complejo proteína-ligando orientado hacia el espacio citosólico. Ambas conformaciones no coexisten al mismo tiempo. La unión con el sustrato en E1 del GLUT induce un cambio en la conformación de E2, permitiendo que la hexosa sea transportada a través de la proteína (Zottola, et al., 1995).

Particularmente para los GLUT's se han tratado de identificar los dominios y los aminoácidos involucrados con la unión y el transporte de glucosa, lo cual ha resultado difícil ya que a la fecha no existe el cristal de la proteína que permita este tipo de análisis (Salas-Burgos, et al., 2004). Sin embargo, se han generado modelos tridimensionales que predicen la identidad de los aminoácidos involucrados en la unión y transporte de glucosa a través de GLUT. Entre los más recientes se encuentran: 1) el modelo propuesto por Salas-Burgos, et al. (2004) para GLUT1 que se construyó usando como molde las estructuras de los cristales del transportador de glicerol-3-fosfato y la translocasa de glucosa-6-fosfato de *Escherichia coli*; y 2) el modelo de Cunningham, et al. (2006) que se construyó a partir de un molde de GLUT1 de la base de datos *Protein Data Bank* (www.ebi.ac.uk/msd/).

Ambos modelos predicen que las 12 α -hélices transmembranales se acomodan o arreglan alrededor de un poro central formado por aminoácidos hidrofílicos. El poro presenta dos cavidades de diferente diámetro que convergen en la parte central y en cuyo interior se encuentran tres dominios implicados directamente en la unión y el transporte de glucosa hacia el interior de la célula (dos dominios

QLS, glutamina-leucina-serina; y un dominio QLG, glutamina-leucina-glicina). Con el modelo también se identificaron los principales aminoácidos (distribuidos en las hélices 2, 4, 5, 7, 8 y 10) que forman el poro y que están implicados en el cambio conformacional del transportador durante el paso de la glucosa (figura 2).

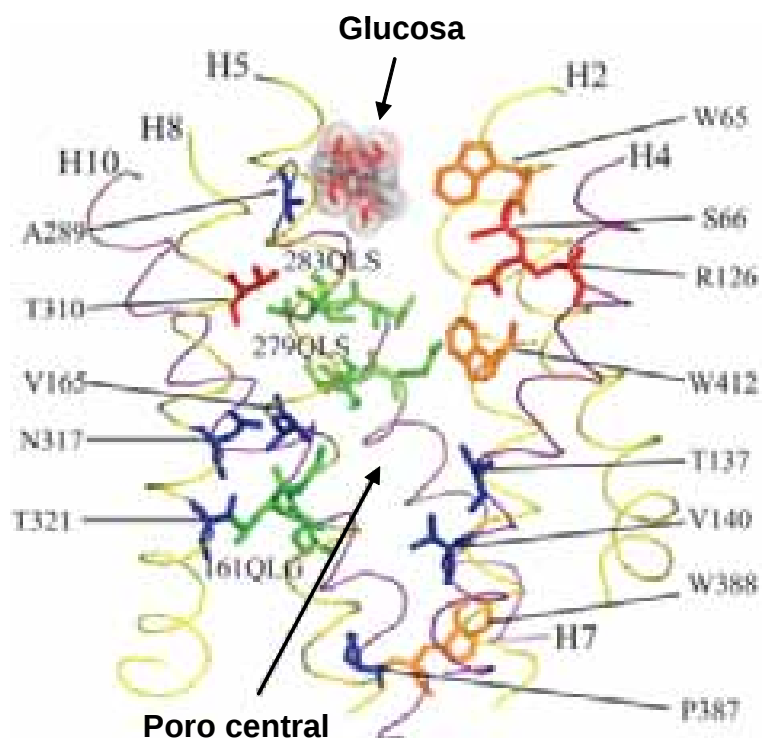


Figura 2. Vista lateral de las hélices que forman el poro central en GLUT1.

Colores de los aminoácidos implicados: en azul los esenciales para el transporte, en naranja los triptófanos distribuidos a través del poro y en verde los dominios QLS y QLG. (H, α -hélice; QLS, glutamina-leucina-serina; QLG, glutamina-leucina-glicina; W, triptófano; A, alanina; T, treonina; V, valina; N, asparagina; S, serina; R, arginina; P, prolina)

1.3. Transporte de glucosa en células tumorales

Las células tumorales consumen glucosa a altas velocidades. Sin embargo, sustratos mitocondriales como la glutamina, los cuerpos cetónicos y el piruvato también son altamente oxidados (Rodríguez-Enríquez, et al., 2006). En líneas tumorales donde la FO aporta la mayor cantidad de ATP (hepatoma de roedor AS-30D y el cáncer cervico-uterino HeLa), la vía glucolítica suministra metabolitos intermediarios (sustratos) para otras vías metabólicas utilizadas durante la proliferación celular, por ejemplo la G6P para la vía de las pentosas fosfato y en consecuencia la generación de NAD(P)H/NAD(P)⁺ y de 5-fosforibosil- α -pirofosfato (PRPP) para la formación de bases púricas; el 3PG para la síntesis de serina y el piruvato para la síntesis de alanina (Baggetto, 1992).

Uno de los factores propuestos que determina el aumento en la actividad glucolítica en varias líneas tumorales es la sobre-expresión de GLUT (Macheda, Rogers & Best, 2005); particularmente la isoforma GLUT1 se sobre-expresa predominantemente en gran parte de las células tumorales. Algunos tumores de rápido crecimiento además de sobre-expresar las isoformas propias, expresan isoformas que originalmente no estaban presentes en el tejido de origen. Tal es el caso de algunas leucemias (U937, HL60 y U1) en donde se sobreexpresa GLUT5 (que no se expresa en leucocitos); y algunas células tumorales de pulmón y ovario en donde se expresa GLUT3, que no se detecta en los tejidos correspondientes de origen (Wood & Trayhurn, 2003). Cabe mencionar que hay diversas teorías que explican los mecanismos involucrados en el aumento de la actividad glucolítica, este tema se aborda más adelante en el apartado titulado “Análisis del control metabólico de la glucólisis en células tumorales”.

La expresión y la sobre-expresión de GLUT en diferentes tipos tumorales se ha evaluado cuantificando la cantidad de proteína presente (por Western Blot y/o RNAm), desafortunadamente y no en todos los casos estos estudios se han

acompañado con la determinación de la actividad de GLUT en condiciones de velocidad inicial, lo que permitiría confirmar que el incremento en la expresión (RNAm y/o proteína) de GLUT se refleja en el incremento de actividad, que a su vez contribuye al aumento del flujo en toda la vía glucolítica. De hecho, en algunos tumores como el glioma C6 (de cerebro) (Nagamatsu, et al., 1996) y el adenocarcinoma de Barrett (de tejido colorectal) (Younes, et al., 1997 (a)) no hay sobre-expresión de GLUT (Tabla 2) aunque se reporten altas velocidades glucolíticas. Una desventaja en considerar solo la síntesis del RNAm o el contenido de proteína como indicativo de la funcionalidad de GLUT, es que con estas aproximaciones se revela la cantidad de enzima total, es decir, no indica la cantidad de enzima activa. Por lo tanto, la determinación cinética de GLUT es necesaria para un análisis más riguroso.

Tabla 2. Diferencias en la expresión de GLUT entre tejidos sanos y líneas tumorales.

Tejido sano	GLUT expresado	Línea tumoral	GLUT sobre-expresado*	GLUT nuevas isoformas	Marcador de expresión	Referencia
Cerebro	1, 3	HOS Glioma C-6	1, 3 -	- -	RNAm	(Waki, et al., 1998; Nagamatsu, et al., 1996; Nishioka, et al., 1992)
Cervical	1	CIN	1	-	RNAm, proteína	(Rudlowski, et al., 2003)
Colorectal	1, 2	CaColI Adenocarcinoma de Barrett	1 -	5 -	RNAm, Proteína	(Mahraoui, et al., 1992; Sakashita, et al., 2001; Younes, et al., 1997(a))
Hígado	2, 9, 10	HepG2	-	1	RNAm	(Aloj, et al., 1999)
Mama	1	MDA-468, MCF-7	1	2, 5	Proteína	(Zamora-León, et al., 1996)
Páncreas	1, 2, 9, 10	β -TC6-F7	-	2	RNAm	(Knaack, et al., 1994)
Retina	1	Y-79, WERI-Rb1	1	4	Proteína	(Tsukamoto, et al., 1997)
Riñón	2, 5	786-O	-	1	RNAm	(Iliopoulos, et al., 1996)

* Sobre-expresado de 10 a 12 veces

Investigaciones preliminares sugieren que la expresión o sobre-expresión de GLUT en células tumorales depende tanto del grado de malignidad como de la etapa del desarrollo tumoral. Por ejemplo, en pacientes con sarcoma de hueso y carcinoma esofágico, el monitoreo del consumo de glucosa utilizando la técnica de PET y el radionúclido 18-FDG reveló una correlación positiva entre el grado de diferenciación tumoral (Tateishi, et al., 2006) y la expresión de GLUT1 (Kato, et al., 2003).

1.4. Caracterización cinética del transporte de glucosa

1.4.1. Definición de las constantes cinéticas

La cinética de una enzima que cataliza una reacción para un solo sustrato (figura 3) puede describirse de manera general (en términos de su actividad) con la ecuación de Michaelis-Menten (Segel & Fisher, 1975):

$$v = \frac{V_m[\text{sustrato}]}{K_m + [\text{sustrato}]}$$

Donde V_m , velocidad máxima; K_m , constante de disociación del complejo enzima-sustrato; $[\text{sustrato}]$, concentración de sustrato.

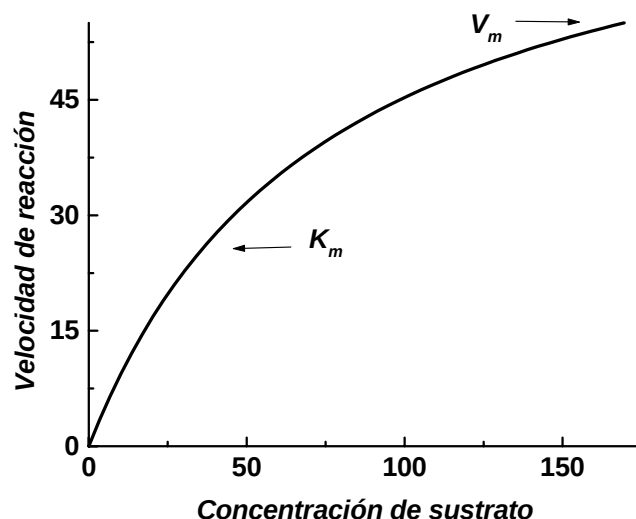


Figura 3. Cinética hiperbólica de enzimas que cataliza una reacción para un solo sustrato (cinética de Michaelis-Menten).

Esta ecuación representa un caso particular para la catálisis de una enzima unireactante, que además describe un comportamiento cinético de tipo hiperbólico. Sin embargo, otras enzimas (las enzimas alostéricas) no tienen este comportamiento. En éstas, la actividad está descrita por la ecuación de Hill que considera la presencia de n dominios o sitios de unión para otros ligandos o el mismo sustrato modificando su afinidad (Weiss, 1997). En este contexto, se introduce el concepto de cooperatividad, que se presenta cuando la unión de una molécula de sustrato al centro catalítico de la enzima modifica (aumentando o disminuyendo la afinidad) la unión de ligandos cuya catálisis es posterior. Este comportamiento es el más común en las enzimas multiméricas, que presentan varias zonas de interacción con el sustrato. En esta condición la ecuación de velocidad para dicha enzima se refiere en términos de $[\text{sustrato}]^n$:

$$v = \frac{V_m [\text{sustrato}]^n}{K_s^n + [\text{sustrato}]^n}$$

Donde V , velocidad; n , número de dominios o sitios de unión en la enzima para el sustrato; V_m , velocidad máxima; K_s^n , constante de disociación intrínseca del complejo enzima-sustrato.

Cuando en la enzima solo existe un sitio de unión para el sustrato ($n=1$), la ecuación se reduce a la ecuación de Michaelis-Menten.

Las enzimas alostéricas pueden presentar ya sea cooperatividad positiva o bien cooperatividad negativa. La primera resulta cuando en una enzima alostérica la unión del sustrato a un dominio o sitio de unión para el sustrato provoca que la afinidad del dominio adyacente aumente su afinidad por el sustrato. El caso contrario, la cooperatividad negativa resulta cuando la unión del sustrato a un dominio o sitio de unión provoca que la afinidad del dominio adyacente disminuya su afinidad por el sustrato.

Cuando se evalúa de manera conjunta la actividad de más de una enzima con el mismo sustrato en común la ecuación de velocidad se modifica (Mendoza-Cózatl & Moreno-Sánchez, 2005), obteniéndose las cinéticas de tipo:

- La cinética hiperbólica + componente lineal: implica la evaluación conjunta de una enzima con cinética hiperbólica y un componente que bien puede no ser enzimático como la difusión pasiva del sustrato (cuando se evalúa a la enzima en la célula completa).

$$v = \left(\frac{V_m [glu \cos a]}{K_m + [glu \cos a]} \right) + m [glu \cos a]$$

Donde m , valor de la pendiente del componente lineal

- La cinética de doble hipérbola: considera la evaluación conjunta de dos enzimas con cinética hiperbólica con diferente afinidad por el mismo sustrato.

$$v = \left(\frac{V_{m1}[glucosa]}{K_{m1} + [glucosa]} \right) + \left(\frac{V_{m2}[glucosa]}{K_{m2} + [glucosa]} \right)$$

- La cinética doble Hill: implica la evaluación conjunta de dos enzimas con cinética hiperbólica cooperativa.

$$v = \left(\frac{V_{m1}[glucosa]^{n1}}{K_{s1}^{n1} + [glucosa]^{n1}} \right) + \left(\frac{V_{m2}[glucosa]^{n2}}{K_{s2}^{n2} + [glucosa]^{n2}} \right)$$

1.4.2. Inhibición enzimática

Los compuestos que se unen a las enzimas disminuyendo parcial o completamente su actividad se llaman inhibidores. Existen básicamente 2 tipos de inhibidores: los inhibidores reversibles y los irreversibles; los primeros se unen a la enzima con interacciones no covalentes como los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y los enlaces iónicos. Este tipo de inhibidores se clasifican de acuerdo al tipo de inhibición que ejercen (Segel & Fisher, 1975):

1. Inhibición competitiva: el inhibidor puede unirse a la enzima libre pero no al complejo enzima sustrato, de tal manera que únicamente afecta la K_m y no la V_m de la enzima; es decir, compite con el sustrato por el sitio de unión. Ejemplo: El malonato, que actúa sobre la enzima succinato

deshidrogenasa (que cataliza hidrólisis de los átomos de hidrógeno presentes en posición trans en el grupo metil del succinato, metabolito intermediario en el ciclo de Krebs) (Kim, 2002).

2. Inhibición mixta: el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre E como al complejo enzima-sustrato, aunque no necesariamente con la misma afinidad. Por lo tanto, los inhibidores de tipo mixto interfieren con la unión del sustrato (incremento de K_m) y con la catálisis en el complejo ES (disminución de V_m). Ejemplo: El NADH que actúa como inhibidor de tipo mixto respecto al NAD^+ y al sustrato betaína-aldehído en la enzima NAD (+)-betaína aldehído deshidrogenasa cuya reacción es catalizar la oxidación irreversible de betaína-aldehído a glicina dependiente de NAD (P)^+ en *Pseudomonas aeruginosa*. (Valenzuela-Soto & Muñoz-Clares, 1993).
3. Inhibición no competitiva: esta es una forma de inhibición mixta en donde la afinidad del inhibidor por la enzima y por el complejo enzima-sustrato es la misma; por lo tanto, no se modifica la K_m (es decir, no se afecta la unión del sustrato a la enzima) pero disminuye V_m (es decir, la unión del inhibidor interfiere con la catálisis del complejo ES). Ejemplo: El fluorofosfato de di-isopropilo (DFP) que forma un complejo con la enzima acetilcolinesterasa (que cataliza la hidrólisis de la acetilcolina a colina y ácido acético en el espacio sináptico) (Li, et al., 2007).
4. Inhibición incompetitiva: el inhibidor solo se une al complejo enzima-sustrato y no a la enzima libre; por lo que el complejo enzima-sustrato-inhibidor es catalíticamente inactivo. Esta forma de inhibición provoca la

disminución de la K_m y de la V_m . Ejemplo: El gipenosido (Gyp) es un inhibidor de tipo incompetitivo respecto al ATP sobre la Na^+/K^+ -ATPasa de cerebro y corazón de rata (que mantiene las concentraciones apropiadas de Na^+ y K^+ en la célula, movilizandolos ambos iones por transporte activo a través de la membrana celular) (Han, et al., 1996).

1.4.3. Método de Dixon

En el método de Dixon la constante de inhibición K_i (constante de equilibrio de la unión reversible del complejo enzima sustrato) se determina graficando el inverso de la velocidad $\left(\frac{1}{v}\right)$ contra la concentración de inhibidor (i), manteniendo la concentración de sustrato (s) constante. Por lo tanto, a dos concentraciones de sustrato, se obtiene una serie de líneas rectas que coinciden en un punto en el segundo cuadrante del gráfico de inhibición. Este punto de convergencia corresponde al valor de K_i (Dixon, 1953).

1.5. Caracterización del transporte de glucosa en células normales y en células tumorales

El transporte de glucosa celular comenzó a estudiarse en microorganismos como *Neurospora crassa*, donde se determinó que GLUT utiliza como sustrato a la 3-oxígeno-metil-glucosa (3-OMG), un análogo estructural de la glucosa presumiblemente no metabolizable por la célula (figura 4). Con este protocolo se identificaron dos componentes con diferentes afinidades por 3-OMG en el mecanismo cinético de GLUT. El valor de K_m determinado para el componente con mayor afinidad fue de 10 μM , y la K_m determinada para el componente de menor afinidad fue de 8 mM (Scarborough, 1970 (a); Scarborough, 1970 (b)). Los estudios se extendieron al modelo de ovocitos de *Xenopus laevis*, donde se logró la sobre-expresión de diferentes isoformas de GLUT (micro inyectando RNAm de GLUT en el ovocito) y su caracterización cinética. Los valores de K_m

determinados para las diferentes isoformas de GLUT fueron de 17-26 mM (GLUT 1), 11-42 mM (GLUT 2), 1.5-10 mM (GLUT 3) y 4-7 mM (GLUT 4) (Gould, et al., 1991; Colville, et al., 1993; Nishimura, et al., 1993). Las diferencias en los valores de K_m reportados se pueden explicar en términos de las condiciones experimentales empleadas en cada ensayo; por ejemplo, algunas de las isoformas se incubaron con análogos de glucosa (2-DOG ó 3-OMG) considerando que GLUT tiene la misma afinidad por estos análogos que por la misma glucosa; el tiempo de incubación (5 a 90 min) y la temperatura (20 y 30 °C) en la que se realizó la determinación indica que la reacción no se realizó en velocidad inicial. A pesar de estas limitantes, es posible comparar los valores de K_m de las diferentes isoformas y proponer que estas diferencias están en función del tipo de célula y tejido en que se expresa cada isoforma de GLUT (al menos en el caso de mamíferos). En estudios posteriores con este modelo de ovocitos se ajustaron las condiciones experimentales y se determinaron valores de K_m y V_m más cercanos a los fisiológicos (tabla 3).

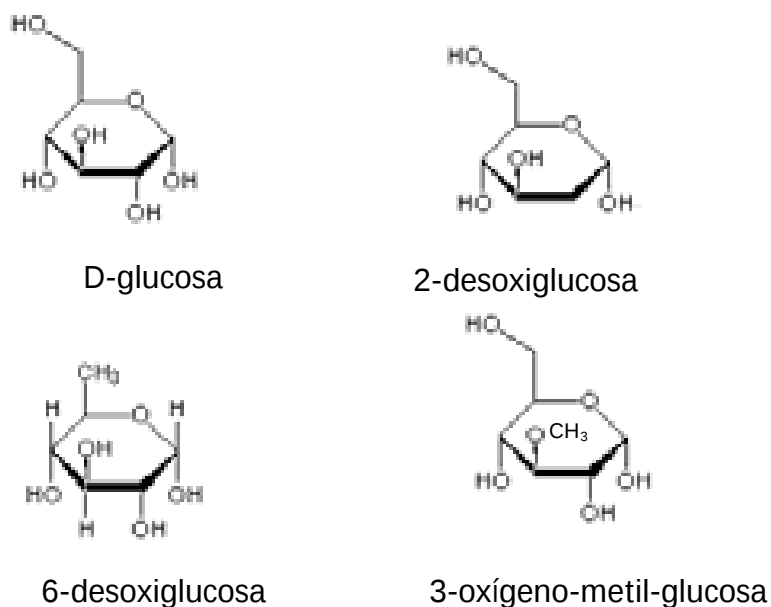


Figura 4. Estructura de los análogos a la glucosa empleados en la determinación del transporte de glucosa.

En la tabla 3 se muestran los valores de actividad de transporte de glucosa determinados en varios microorganismos, así como las diferencias experimentales de cada ensayo.

Tabla 3. Determinación de las constantes cinéticas para el GLUT en diferentes microorganismos.

	S	V_m [nmol(min x mg) ⁻¹]	K_m (mM)	T (°C)	t (min)	Referencia
<i>Neurospora crassa</i>	gluc	46	8	37	60	(Scarborough, 1970 (a); Scarborough, 1970 (b))
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gluc	663	31	25	0.1	(Elbing, et al., 2004)
<i>Trypanosoma brucei</i>	gluc	552	0.5	37	5	(Seyfang & Duszenko, 1991)
<i>Xenopus laevis</i>	3-OMG	4	26	22	60	(Nishimura, et al., 1993)

Donde S, sustrato; gluc, glucosa; T, temperatura; t, tiempo de incubación en presencia del sustrato.

La comparación de los valores de actividad del GLUT en diferentes microorganismos arrojó diferencias importantes en los parámetros cinéticos por las diferentes condiciones experimentales ensayadas, ya que los parámetros determinados (K_m y V_m) se modificaron en función del tipo de sustrato, la temperatura y el tiempo de reacción. Además, por el aporte de las propiedades cinéticas de cada isoforma de GLUT presente en los diferentes tipos de célula, probablemente se modificaron los parámetros cinéticos y por lo tanto se obtuvieron valores aparentes.

En células normales y tumorales de rápido crecimiento se ha realizado la caracterización cinética del transporte de glucosa siguiendo protocolos similares a los descritos anteriormente (tabla 4 y 5).

Tabla 4. Determinación de los parámetros cinéticos de GLUT en líneas celulares normales.

	S	V_m [nmol(min x mg) ⁻¹]	K_m (mM)	T (°C)	t (min)	Referencia
Músculo esquelético	2-DOG	0.02	ND	37	10	(Sarabia, et al., 1992)
Fibroblastos embrión	3-OMG	3	3	25	0.2	(Christopher, Kohlbacher & Amos, 1976)
Páncreas	3-OMG	25	16	37	0.25	(Hughes, et al., 1992)
Hepatocito	3-OMG	35	7	ND	ND	(Levitsky, et al., 1994)

ND, No determinado.

En el caso de las células tumorales, los parámetros cinéticos determinados se modifican hasta en un orden de magnitud. Estas diferencias no solo se atribuyen a los diferentes protocolos empleados sino a otros factores intrínsecos de la célula como son el metabolismo predominante, el grado de diferenciación y malignidad.

Tabla 5. Determinación de los parámetros cinéticos de GLUT en líneas celulares tumorales.

	S	V_m [nmol(min x mg) ⁻¹]	K_m (mM)	T (°C)	t (min)	Referencia
EAT	2-DOG	25.5	0.8	37	0.1	(Fung, et al., 1986)
Glioma D-54MG	2-DOG	8	<1	25	0.5	(Griguer, Oliva, & Gillespie, 2005)
Glioma U-251MG	2-DOG	68	<1	25	0.5	(Griguer, Oliva, & Gillespie, 2005)
Ishikawa ECC	2-DOG	2.3	0.8	25	0.5	(Medina & Owen, 2002)
Carcinoma mamario MDA-468	2-DOG	4	2	25	10	(Zamora-León, et al., 1996)
Carcinoma mamario MCF-7	2-DOG	1	2	25	10	(Zamora-León, et al., 1996)

Donde S, sustrato; EAT, Erlich Ascities Tumor; ECC, Endometrial Cancer Cells.

Al analizar las diferentes condiciones experimentales utilizadas (tipo de sustrato, temperatura y tiempo de incubación en presencia de sustrato) se puede concluir que la mayoría de las caracterizaciones cinéticas se apoyaron en varias consideraciones: 1) la afinidad de GLUT por glucosa es la misma que la de sus análogos (3-OMG, 2-DOG); 2) los análogos utilizados no son metabolizados por la HK; 3) la actividad de GLUT medida a tiempos largos (más de 10 min) es igual que en condiciones de velocidad inicial (Sarabia, et al., 1992) suponiendo que el análogo no se metaboliza; y 4) los inhibidores del transporte de glucosa (citocalasina B, floretina, HgCl₂, azida) son selectivos, específicos y efectivos para disminuir la actividad del transportador en su totalidad.

Por lo anterior, un objetivo particular de este trabajo fue implementar las condiciones experimentales adecuadas para determinar de manera confiable la actividad de GLUT en condiciones de velocidad inicial y empleando glucosa como sustrato fisiológico.

1.6. Inhibidores del transporte de glucosa

1.6.1. Citocalasina B

Las citocalasinas son inhibidores parciales, poco selectivos del transporte de glucosa (Griffin, Rampal, & Jung, 1982; Kletzien, Perdue, & Springer, 1972; Haidle & Myers, 2004); las citocalasinas A, B y F se obtienen del hongo *Helminthosporium dematioideum*; las citocalasinas C y D se obtienen de *Metarrhizium anisopliae*; la citocalasina E se obtiene de *Rosellinia necatrix* y las citocalasinas H y J se obtienen de *Phomopsis paspali* (Aldridge & Turner, 1969). Aunque su enzima blanco es el GLUT, las citocalasinas (B y D) también inhiben la motilidad celular por su unión a los filamentos de actina (Haidle & Myers, 2004), o afectan la angiogénesis (citocalasina E) en células del endotelio capilar de bovino (Udagawa, et al., 2000).

Interesantemente, la citocalasina B ejerce su inhibición de una manera dosis-dependiente. A bajas concentraciones (0.1- 10 μM) se inhibe el transporte de glucosa en células de mamífero, mientras que a concentraciones altas (100 μM) afecta la morfología celular e inhibe la formación de filamentos de actina (Lin, Lin & Flanagan, 1978).

La citocalasina B (CB) interacciona con GLUT formando puentes de hidrógeno entre el N2, el O7 y el O23 del inhibidor con los sitios catalíticos del GLUT (figura 6). Los sitios de unión con el inhibidor son análogos al O1, O3 y O6 de la molécula de β -D-glucosa (Griffin, Rampal, & Jung, 1982).

Además la región hidrofóbica del C13 al C19 en la CB (figura 6) aparentemente es necesaria para interactuar con algunos dominios hidrofóbicos de la proteína. Sin embargo aun no se ha determinado con precisión el sitio de unión de la CB en el GLUT, aunque se ha propuesto un modelo que predice que la CB se une en el dominio intracelular de la enzima impidiendo el paso de la molécula de glucosa (Salas-Burgos, et al., 2004) (figura 6). Con respecto al tipo de inhibición del transporte de glucosa en células no tumorigénicas, algunos investigadores han descrito que la CB es un inhibidor de tipo competitivo, mientras que otros han propuesto que la inhibición del transporte de glucosa es de tipo no competitivo (tabla 6), estas diferencias pueden atribuirse a las condiciones experimentales en las que se realizó el ensayo de inhibición, o bien al modelo de estudio *per se*, ya que difícilmente se pueden identificar diferencias del tipo de inhibición que ejerce la CB entre las isoformas de GLUT activas en la membrana celular.

Tabla 6. Determinación de la K_i por citocalasina B en células normales.

Modelo de estudio	GLUT	K_i (μ M)	Tipo de inhibición	Referencia
Eritrocito	1	0.4-0.6	Competitiva	(Griffin, Rampal, & Jung, 1982)
Hepatocito de rata	2	1.9	ND	(Axelrod & Pilch, 1983)
Miocitos de rata L6	1	0.1-0.5	ND	(Whitesell, et al., 2003)
<i>Xenopus laevis</i>	2	7	No competitiva	(Colville, et al., 1993)
<i>Xenopus laevis</i>	3	2	No competitiva	(Colville, et al., 1993)

ND, no determinado.

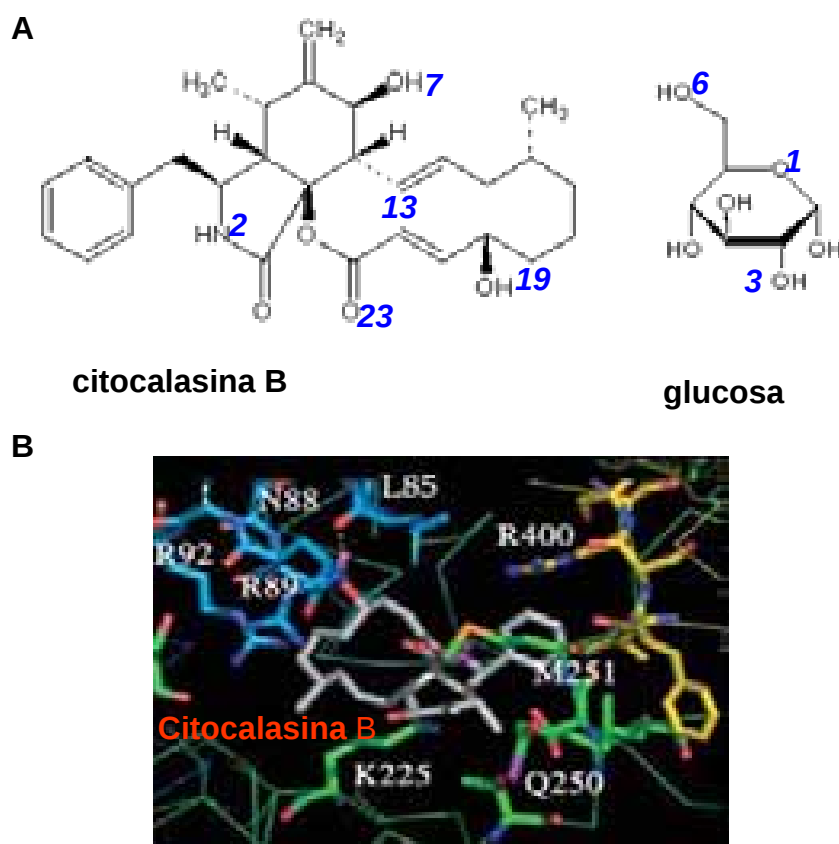


Figura 6. A) Analogía entre los grupos funcionales de la citocalasina B y la glucosa involucrados en la unión al GLUT. B) modelo de predicción de la unión de la citocalasina B al dominio intracelular del GLUT. Se indican los aminoácidos involucrados en la unión (W, triptófano; N, asparagina; R, arginina; L, leucina; M, metionina; K, lisina; Q, glutamina).

1.6.2. Floretina

La floretina inhibe de manera competitiva el transporte de glucosa con valores de IC_{50} de 40 a 60 μM en eritrocito y *Saccharomyces cerevisiae* (Kasahara & Kasahara, 1996), y valores de K_i de 3 μM en eritrocito (LeFevre & Marshall, 1959 ; Wheeler & Hinkle, 1981). Sin embargo al igual que la citocalasina B, se desconoce con precisión el sitio de unión con el GLUT, aunque se ha

propuesto un modelo que predice que la floretina puede unirse a dos dominios diferentes (figura 7) ubicados en los extremos del poro central del GLUT1 (Salas-Burgos, et al., 2004).

La floretina es el derivado aglucón del florizina, compuesto fenólico obtenido del extracto de raíz de manzana (LeFevre & Marshall, 1959) y tiene diversos efectos a nivel de membranal relacionados con su capacidad hidrofóbica para difundir a través de la membrana celular modificando su potencial electroquímico. La floretina inhibe a la proteína cinasa C y disminuye la activación de canales de $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ (Owen, 1974) en fibras nerviosas de *Xenopus laevis* a concentraciones de 10-200 μM (Koh, Reid, & Vogel, 1994). Además inhibe el transporte de mio-inositol (mediado por GLUT 13) (Berry, et al., 1994), y de diversas moléculas con diferente polaridad como glicerol, urea y cloro a concentraciones de 25-50 μM (Toon & Solomon, 1987; Cseh & Benz, 1999)

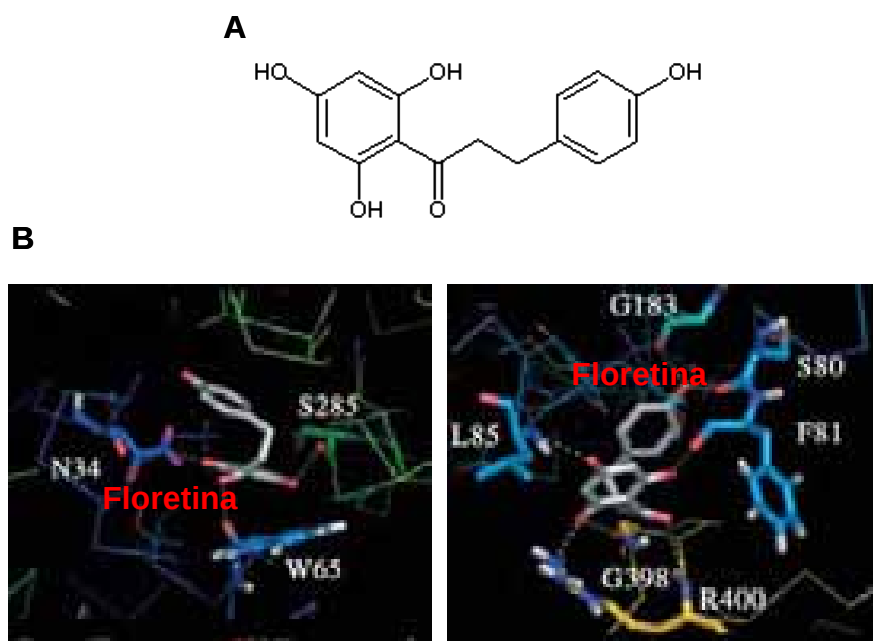


Figura 7. Floretina, A) estructura molecular, B) y C) modelos de predicción de la unión de floretina a dominios diferentes en GLUT1. Se indican los aminoácidos involucrados en la unión (L, leucina; F, fenilalanina; G, glicina; R, arginina; S, serina; N, asparagina; W, triptófano).

1.7. Estimulación del transporte de glucosa

1.7.1. Efecto de la insulina

Una ingesta rica en carbohidratos provoca que la concentración de glucosa en sangre se incremente de 4 – 6 mM hasta 11 mM en humano y en roedor. En respuesta a la elevación de glucosa, la insulina se libera de las células- β pancreáticas regulando el transporte de glucosa mediado por GLUT4 en las células del músculo esquelético, cardíaco y en los adipocitos. El efecto directo de la insulina sobre la célula es la redistribución reversible de los depósitos intracelulares de GLUT 4 en la membrana celular, aumentando la cantidad de transportador expuesto y por lo tanto la actividad de transporte de glucosa. En la figura 8 se representa el mecanismo por el cual la insulina promueve la orientación de GLUT 4 hacia la membrana celular (mediado por la activación del receptor de insulina IR).

La vía de activación de las proteínas cinasas B y C requiere que el receptor de insulina (IR) se active por su sustrato catalizando la fosforilación de la fosfatidil-inositol-3 cinasa; en la catálisis se libera fosfatidil-inositol trifosfato que es el sustrato para la cinasa dependiente de fosfatidil-inositol, que activa mediante fosforilación a las proteínas cinasa C y cinasa B. El paso intermedio entre la activación de estas enzimas y la redistribución de GLUT 4 parece estar parcialmente mediado por la activación de una vía alterna donde se involucran dominios ricos en caveolina. Estos dominios forman invaginaciones en la membrana plasmática que funcionan como un sistema particular de endocitosis y exocitosis (Anderson, 1998). En este re-arreglo, los dominios transportan al GLUT del exterior de la célula hacia sitios específicos en el citosol, o bien lo liberan hacia el espacio extracelular. Se plantea que existen IR en este tipo de dominios que activan a la proteína Cbl, a la proteína asociada con Cbl (CAP) y a la proteína sustrato adaptador (APS). Al parecer, estas proteínas

actúan como sustrato del receptor y forman un complejo con otras proteínas como la proteína Crk-C3G y la proteína GTPasa TC10 involucradas en el control de las funciones de la actina sobre el citoesqueleto. Además, se ha propuesto que los componentes del citoesqueleto (actina y microtúbulos) juegan un papel importante en la redistribución de GLUT 4. Algunos autores sugieren que la polimerización de actina y la organización de los microtúbulos intervienen en la redistribución de GLUT 4 desde los depósitos intracelulares hasta la región perinuclear de la célula y la permanencia de los depósitos de GLUT 4 en condiciones basales. Desafortunadamente, el papel potencial de estos componentes en la translocación hacia la superficie celular de GLUT 4 mediada por insulina se desconoce (Watson, Kanzaki, & Pessin, 2004).

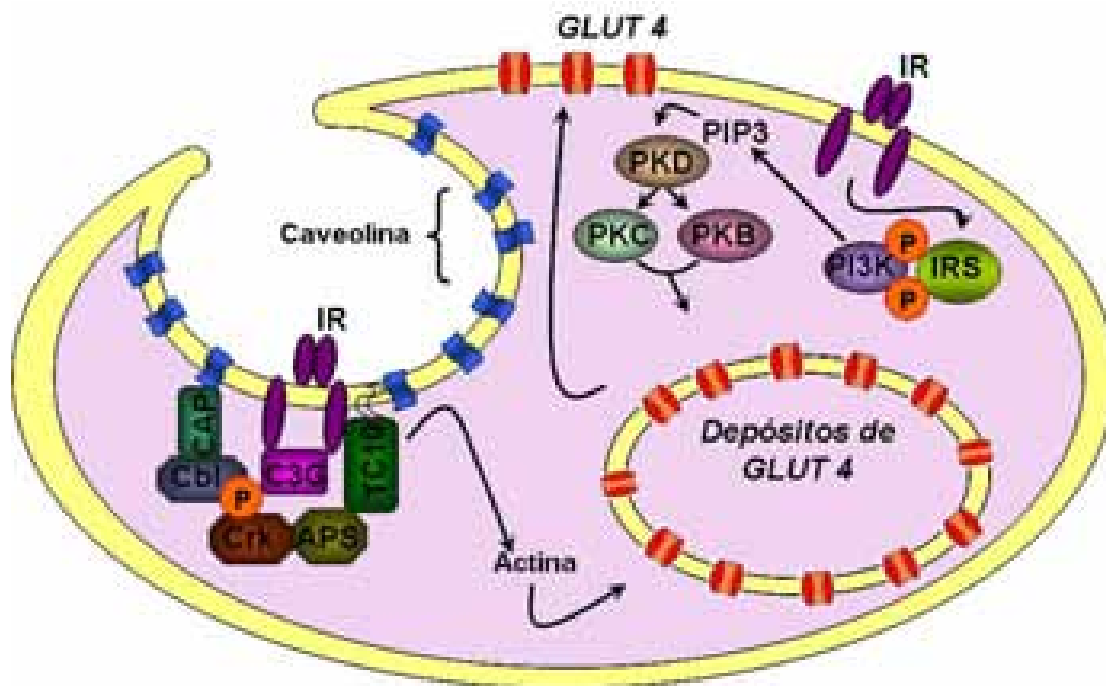


Figura 8. Redistribución de GLUT4 en la membrana celular. La estimulación de IR por insulina provoca la fosforilación a nivel de tirosina de las proteínas IRS que a su vez desencadenan la vía de PKC-PKB y/o la vía de caveolina.

Se ha descrito que algunas líneas tumorales de rápido crecimiento como el tumor alveolar rabdomiosarcoma (ARMS) (Armoni, et al., 2002), el adenocarcinoma endometrial A-MEC, HEC1A e Ishikawa (Shibata, et al., 2007) sobre expresan GLUT 4. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína se ha cuantificado en función de la cantidad de RNAm, sin evaluar directamente la actividad de la enzima activa. Además, hay poca información en la literatura referente a la estimulación del transporte de glucosa por insulina en células tumorales, tal es el caso de las células transformadas MEC-LAP (Shibata, et al., 2007) en las que se determinó que hay estimulación de la actividad transporte de glucosa a concentraciones fisiológicas de insulina.

1.8. Análisis del control metabólico de la glucólisis en células tumorales

Nuestro grupo de trabajo (Rodríguez-Enríquez, et al., 2000 ; Marín-Hernández, et al., 2006 ; Rodríguez-Enríquez, et al., 2006; Moreno-Sánchez, et al., 2007) ha demostrado que el hepatoma de roedor AS-30D, el cáncer cervico-uterino (HeLa) y la línea transformada de riñón fetal (HEK293) aumentan su velocidad de glucólisis aún en presencia de concentraciones saturantes de oxígeno. Otros subtipos de hepatomas (Morris, Erlich, AS-30D y el fibrosarcoma 1929) también desarrollan altas velocidades de producción de lactato (3 - 45 nmol (min x mg proteína)⁻¹), que rebasan hasta por 50 veces la glucólisis de células normales no tumorigénicas como hígado y riñón (0.8 nmol (min x mg proteína)⁻¹) (Kashiwaya, et al., 1994).

El incremento en la glucólisis tumoral se asocia con la activación de varios oncogenes (*c-myc*, *h-ras* y *v-src*) y con la expresión del factor inducible por hipoxia HIF-1 α (Tabla 7). La activación de oncogenes, promueve la sobre-expresión (a nivel de RNAm y en algunos casos de contenido de proteína) de los genes que codifican para las enzimas de la vía glucolítica incluyendo el GLUT (Zu & Guppy, 2004). Entre las enzimas que se modifican esta la HK II

que en el hepatoma AS-30D es la isoforma predominantemente activa y se encuentra unida a la membrana mitocondrial externa (Nakashima, et al., 1988; Bustamante & Pedersen, 1977). Esta enzima presenta baja sensibilidad a la inhibición por su producto G6P y se relaciona con la prevención de eventos apoptóticos como la liberación de citocromo c (Marín-Hernández, et al., 2006). Otro ejemplo es la PFK-1 que en células HeLa y Erlich es menos sensible a los efectos del citrato y ATP (potentes inhibidores alostéricos) como resultado del incremento en la concentración citosólica de fructosa-2,6-bisfosfato (su principal activador).

Cabe mencionar que en células de mamífero existen 4 isoformas de HK (HK I - IV) que difieren por sus propiedades cinéticas, su distribución tejido-específica y su localización intracelular (Moreno-Sánchez, et al., 2007). En células tumorales de rápido crecimiento (CTRC) la isoforma predominante es la HK II que se encuentra unida a la membrana mitocondrial externa (Parry & Pedersen, 1983), en el caso del hepatoma AS-30D la actividad de esta enzima llega a ser hasta 300 veces mayor que en hígado (Nakashima, et al., 1988).

Tabla 7. Principales mecanismos involucrados en el incremento del flujo glucolítico tumoral.

	Tipo de célula tumoral	
	Roedor	Humano
Aumento en la expresión de isoenzimas glucolíticas y GLUT.	Hepatomas AS-30D, Norvikoff, Erlich, Morris 3924.	Carcinoma HepG2, cáncer de mama MCF-7 y T47D, carcinoma HeLa, glioblastoma U87.
Disminución en la expresión de enzimas oxidativas y transportadores mitocondriales.	Hepatomas Erlich, Morris, Norvicoff, Yoshida.	Carcinoma HeLa, tumores de mama Cf-7, C3H.
Disminución en la cantidad de mitocondria por célula.	Carcinomas C-57, HC-252	
Inhibición de la fosforilación oxidativa por activación de la glucólisis (efecto Crabtree).	Hepatoma AS-30D, Erlich-Lettré.	Carcinoma HeLa, HT29
Modificado de Moreno-Sánchez, et al., 2007.		

1.9. Teoría del análisis del control metabólico

1.9.1. Sitios de control en una vía metabólica

Los enfoques experimentales utilizados en la identificación de las enzimas limitantes o regulatorias en una vía metabólica son los siguientes:

1. Inspección de la arquitectura de la vía metabólica. Para alcanzar la mayor eficiencia, el control de flujo debe residir en las enzimas ubicadas al inicio de la vía o después de una ramificación.
2. Reacciones termodinámicamente alejadas del equilibrio. El control reside en las reacciones en donde la constante de equilibrio sea menor a la unidad.
3. Enzimas con la V_m menor determinada en extractos celulares. El control recae en la enzima con menor velocidad.
4. Enzimas alostéricas o cooperativas, el control recae sobre estas porque son susceptibles de alteración de sus propiedades cinéticas.
5. Forma de la curva de inhibición del flujo metabólico: Una curva sigmoideal en la gráfica de $[I]$ vs flujo indica que la enzima sensible al inhibidor I no controla, mientras que una curva hiperbólica indica control del flujo por la enzima susceptible al inhibidor.

Al identificar los sitios de una vía metabólica con al menos uno de los criterios experimentales enumerados aquí, se puede concluir cual es la enzima que limita el flujo metabólico. Sin embargo, el concepto de “enzima clave o limitante” es parcialmente cierto, ya que el control de flujo en la vía metabólica se reparte entre varias enzimas, y no necesariamente se ubica en una sola de ellas (Moreno-Sanchez, et al., 2005).

La Teoría del Control Metabólico permite cuantificar el control que ejerce una enzima sobre el flujo y sobre la concentración de un intermediario, además de que explica el porqué una enzima ejerce control y otras no.

El análisis del control metabólico determina cuantitativamente el grado de control que ejerce cada enzima (E_i) sobre el flujo total de la vía (J) y la concentración de metabolito (M), este se denomina coeficiente de control de flujo $C_{E_i}^J$ y coeficiente de control de concentración de metabolito $C_{E_i}^M$.

Cuando se estudia una vía metabólica como la fosforilación oxidativa, los valores de $C_{E_i}^J$ pueden determinarse titulando el flujo total de la vía con inhibidores específicos para cada enzima como la rotenona, la antimicina, el cianuro y la oligomicina. Sin embargo, la glucólisis no tiene inhibidores específicos; por ello, una aproximación alternativa es el análisis de elasticidades (Fell, 1997), que consiste en la determinación experimental de la sensibilidad (o coeficiente de elasticidad $\varepsilon_M^{E_i}$) de bloques de enzimas a un intermediario común M . Variaciones en la actividad de cada bloque de enzimas en estado estacionario pueden obtenerse titulando con diferentes concentraciones de un sustrato inicial o un inhibidor del bloque de enzimas. El bloque que genera el intermediario común M se denomina bloque productor ($E1$), mientras que el bloque consumidor de M se denomina bloque consumidor ($E2$). Aplicado el teorema de la sumatoria (1):

$$\sum C_{E_i} = 1 \quad (1)$$

Y de la conectividad (2) de la teoría del análisis del control metabólico, se pueden calcular los valores de $C_{E_i}^J$. El teorema de la conectividad establece que una vía metabólica puede dividirse en dos bloques de enzimas alrededor de algún intermediario X : el bloque productor de X (o $E1$) y el bloque consumidor de X (o $E2$). Por lo tanto, en este sistema de dos bloques el teorema de la conectividad está definido por la ecuación 2.

$$\left(\frac{C_{E1}^J}{C_{E2}^J} \right) = - \left(\frac{\varepsilon_M^{E2}}{\varepsilon_M^{E1}} \right) \quad (2)$$

1.9.2. Control de la glucólisis en la línea tumoral AS-30D

Las enzimas que ejercen mayor control en el flujo glucolítico en células no tumorigénicas (eritrocito humano, hepatocito y corazón perfundido de rata) son la HK (60-80% del control total) y la PFK-1(20-30% del control total) (Kashiwaya, et al., 1994). El resto del control se encuentra distribuido entre las enzimas HPI, ALD, TPI, GAPDH, PGK, PGM, ENO, PYK y LDH. Desafortunadamente en estos estudios, el transportador de glucosa no se ha evaluado junto con el resto de las enzimas glucolíticas por lo que su “control” sobre la vía no se ha establecido. Debido a las modificaciones bioquímicas de la vía glucolítica tumoral, es correcto pensar que la distribución del control pueda estar modificado. En nuestro laboratorio ya se evaluó la distribución del control de flujo de la glucólisis en hepatoma AS-30D (Marín-Hernández, et al., 2006) (Tabla 8) y los resultados mostraron que el mayor porcentaje de control de la vía recayó en la denominada parte alta de la glucólisis que consiste en el GLUT, la HPI y la PFK-1. Los segmentos de enzimas en donde se obtuvieron valores negativos para los C_{Ei}^J indican que la fuga de metabolitos intermediarios como sustratos o como productos de enzimas fuera de la vía ejercen control sobre el flujo total de la glucólisis. Estas enzimas constituyen dos vías metabólicas que deben de considerarse en el análisis: 1) las vías que generan metabolitos; como son la degradación de alanina y de glutamina que generan piruvato, y la degradación de glucógeno que genera G6P; y 2) las vías que consumen metabolitos; como la vía de las pentosas fosfato que consume G6P, la síntesis de triglicéridos que consume DHAP, y la síntesis de serina que consume 3PG (figura 9).

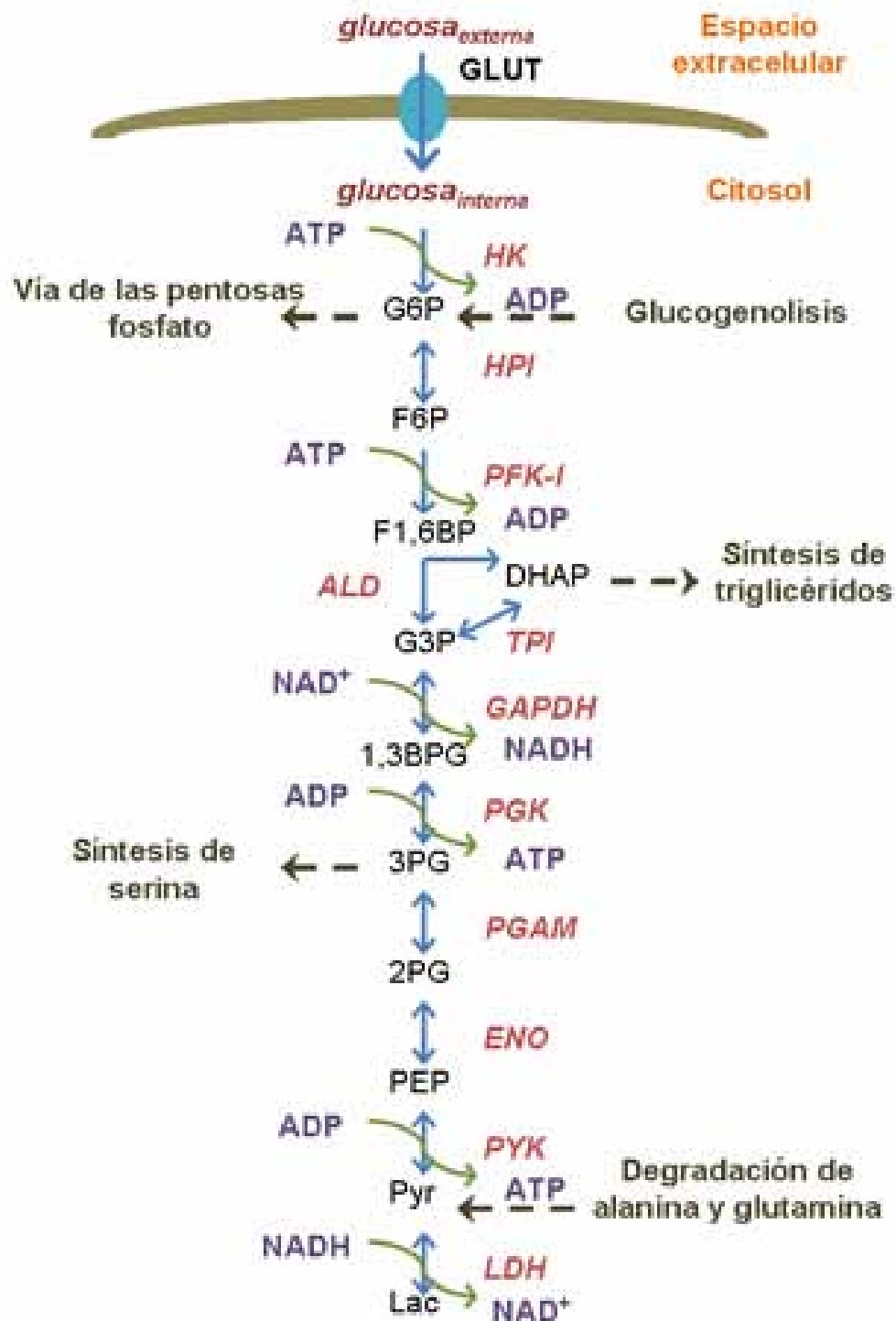


Figura 9. Representación esquemática de la vía glucolítica en células normales resaltando los metabolitos que alimentan las vías metabólicas ramificantes

Tabla 8. Distribución del control de la glucólisis en células AS-30D.

Enzimas y fugas de la vía glucolítica	C_{Ei}^J
Parte alta de la vía	
GLUT + HK	0.71
Ciclo de las pentosas + HPI + síntesis de glucógeno	-0.02
PFK-1	0.06
Parte baja de la vía	
Aldolasa, TPI, GAPDH, PGAM, Enolasa, PYK, LDH, demanda de ATP, enzimas consumidoras de piruvato.	0.25
$\sum C_{Ei}^{glucólisis} = 1$	

Modificado de Marín-Hernández, et al., 2006.

Con la aproximación de las elasticidades se demostró que el mayor porcentaje del control de la glucólisis recae en la HK y en el GLUT. Por lo tanto, para esclarecer cual es la contribución de GLUT sobre este control fue necesario determinar sus propiedades cinéticas. Aunque se ha documentado que el hepatoma AS-30D depende mayoritariamente de la fosforilación oxidativa desde el punto de vista energético (Rodríguez-Enríquez, et al., 2000), la importancia del estudio de la vía glucolítica en esta línea tumoral radica en el suministro de metabolitos intermediarios como la glucosa-6-fosfato, la fructosa-6-fosfato y la DHAP que participan en otras vías metabólicas como la síntesis y la degradación de glucógeno, el ciclo de las pentosas fosfato, la síntesis de glicerol, triacilglicerol, y la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos.

2. HIPÓTESIS

El transportador de glucosa ejerce un control significativo en la glucólisis del hepatoma AS-30D.

3. OBJETIVO GENERAL

Definir la contribución de GLUT al control metabólico de la glucólisis en células tumorales AS-30D.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los parámetros cinéticos del transportador de glucosa en condiciones óptimas de velocidad inicial, así como la sensibilidad a inhibidores y activadores del transporte.
 - i) Implementar la técnica para medir el transporte de glucosa en células aisladas de AS-30D.
 - ii) Determinar el efecto de citocalasina B y floretina (inhibidores del transporte de glucosa) sobre GLUT.
 - iii) Determinar el efecto de la fructosa sobre la velocidad de transporte estimulado por glucosa.
 - iv) Determinar el efecto de la insulina sobre la actividad del transporte de glucosa.
2. Determinar el tipo de isoformas de GLUT que se expresan en AS-30D.
3. Emplear la técnica para medir el transporte de glucosa en otras líneas tumorales de interés clínico (HeLa).

5. METODOLOGÍA

5.1. Propagación y obtención de células AS-30D.

El tumor se propagó intraperitonealmente por inoculación de 2 ml de líquido ascítico ($2 - 4 \times 10^8$ células/ml), en una rata hembra de la cepa Wistar de 250 g de peso. La rata inoculada fue alimentada *at libitum* de 7 a 10 días. Posteriormente se practicó dislocación cervical y se extrajeron 35-50 ml de líquido de ascitis de la cavidad peritoneal (2×10^{10} células totales).

5.2. Purificación y cuantificación de células AS-30D.

Una vez que se extrajo el líquido de ascitis se centrifugó a 1500 rpm por 2 min a 4°C. El sedimento que contiene las células tumorales y componentes celulares sanguíneos se resuspendió en 30 ml de medio Krebs-Ringer (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM, CaCl_2 1.4 mM, KH_2PO_4 1 mM, MgCl_2 1 mM), pH 7.4 y se centrifugó a 1100 rpm en una centrifuga refrigerada. Este procedimiento se repitió 3 veces más. El pellet final se resuspendió en 10 ml de medio Krebs-Ringer y se cuantificó la proteína por el método de Biuret. Finalmente la suspensión celular se ajustó a la concentración final requerida en mg de proteína celular/ml utilizando BSA como estándar.

5.3. Preparación de extractos celulares.

Se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión de células AS-30D (60 mg/ml) y se resuspendió en medio suplementado TRIS-HCl (Medio TRIS-HCl pH 7.6 suplementado con PMSF 1 mM (inhibidor de proteasas), DTT 5 mM y EDTA 1 mM). Posteriormente se realizaron 3 ciclos de congelación (en nitrógeno líquido) y descongelación en un baño de agua a 37°C. La suspensión obtenida

enriquecida con la fracción citosólica se centrifugó nuevamente a 1500 rpm durante 5 minutos y a 20000 rpm durante 20 minutos con la finalidad de eliminar el paquete de organelos celulares contaminantes. El extracto obtenido fue colectado para la determinación de actividad de HK citosólica.

5.3.1. Preparación de extractos celulares para el análisis de Western Blot

Los extractos celulares de proteína total empleados para el análisis de Western Blot fueron preparados como se describe por Tran J, et al., 1999. El buffer de lisis empleado fue preparado con IGEPAL NP40 1%, desoxicolato de Na 0.5%, SDS 0.1% y cocktail Completo de inhibidor de proteasas 2%: PMSF 100 mM (modificado de Stacey, et al., 1992).

5.4. Determinación de actividades enzimáticas.

5.4.1. Actividad de HK en extractos celulares

La determinación de la actividad de HK proveniente de extractos citosólicos se realizó espectrofotométricamente con el ensayo acoplado a la enzima G6PDH (1 U), con glucosa (5 mM), ATP (10 mM), $MgCl_2$ (15 mM) y NADPNa (1 mM) en medio MOPS (50 mM) pH 7. Se cuantificó la generación de NADPH a 340 nm como producto de la reacción. La reacción se inició con la adición de la glucosa después de 30 segundos de incubación a la temperatura requerida (Bergmeyer, 1983).

5.4.2. Actividad de HK en la fracción mitocondrial

Las mitocondrias aisladas a partir de células AS-30D y la fracción mitocondrial se prepararon según el procedimiento descrito por López-Gómez, et al., 1993. La determinación de la actividad de HK proveniente la fracción mitocondrial se

realizó espectrofotométricamente con el ensayo acoplado a la enzima G6PDH (1 U), con glucosa (5 mM), ATP (10 mM), MgCl_2 (15 mM) y NADPNa (1 mM) en KME (KCl 125 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1mM) pH 7.2. Se cuantificó la generación de NADPH a 340nm como producto de la reacción. La reacción se inició con la adición de la glucosa después de 30 segundos de incubación a la temperatura requerida (Bergmeyer, 1983).

5.5. Determinación de velocidad de glucólisis a 15 y 37°C

Para determinar la velocidad de glucólisis en células AS-30D a 37 °C se preincubaron 3 ml de suspensión celular (15 mg/ml, medio Krebs-Ringer pH 7.4) en agitación orbital constante a 150 rpm. Después de 10 min, se adicionó glucosa (5 mM) y la reacción fue detenida con ácido perclórico (3 % v/v) a los 0 y 3 minutos posteriores a la adición del sustrato. Las muestras se neutralizaron con KOH 3 N/Tris 0.2 M y fueron empleadas para la cuantificación de metabolitos.

Para determinar la velocidad de glucólisis a 15 °C se modificó el protocolo de incubación: después de la preincubación por 10 min a 37 °C se realizó una incubación durante 1 min a 15 °C en agitación orbital constante a 150 rpm. Posteriormente continuó con el protocolo descrito anteriormente.

5.6. Cuantificación de metabolitos

5.6.1. Glucosa-6-fosfato

La cuantificación de G6P se realizó espectrofotométricamente con el ensayo acoplado a G6PDH (1 U) y PGI (1 U) con MgCl_2 (5 mM) y NADPNa (1 mM) en medio EGTA (1 mM) - HEPES (50 mM) pH 7.4. Se cuantificó la generación de NADPH como producto de la reacción a 340 nm. La reacción se inició con la adición de la enzima G6PDH (1 U) después de 30 segundos de incubación a 37°C y se continuó con la adición de la enzima PGI (1 U) (Bergmeyer, 1974).

5.6.2. L-lactato

La determinación se realizó espectrofotométricamente con el ensayo acoplado a la enzima LDH (2.5 U) con NADNa (1 mM) en medio Hidrazina (0.4 M) - Glicina (0.5 M) pH 9. Se cuantificó la generación de NADH como producto de la reacción a 340nm. La reacción se inició con la adición de la muestra que contiene el L-lactato después de 3 min de incubación a 37°C (Bergmeyer, 1974).

5.7. Preparación del stock de glucosa con marca radiactiva y preparación del stock de inhibidor.

Se empleó un stock de glucosa con marca radiactiva marca Perkin-Elmer® de 2-H³-glucosa preparado de la siguiente manera:

900 µl glucosa 200 mM + 100 µl 2-H³-glucosa (20 Ci/mmol)

La concentración final del stock por dilución de glucosa marcada con 2-H³-glucosa fue de 180 mM con una actividad específica de 100,000 cuentas por minuto (CPM)/µl. También se prepararon stocks de 18 mM y 1 M de glucosa marcada que fueron empleados en la determinación de la cinética de transporte de GLUT.

Los inhibidores empleados citocalasina B y floretina (Sigma Chem, MO.) fueron preparados en DMSO a una concentración final de 2.1 y 10 mM, respectivamente.

5.8. Determinación de la actividad de GLUT

Para determinar la actividad de GLUT se preincubaron 3 ml de suspensión celular (1 mg/ml, medio Krebs-Ringer pH 7.4) en un baño con agitación orbital constante durante 10 min, a 37 °C y 150 rpm. Al minuto 10 se tomó una alícuota de 1.6 ml de suspensión celular y se incubó a 15 o 25 °C en agitación constante a 250 rpm. Al minuto 11 se adicionó glucosa marcada sobre esta alícuota de suspensión celular a la concentración requerida (0 – 40 mM).

Durante la reacción las células se mantuvieron en agitación orbital constante a 250 rpm. A los 15 y a los 30 segundos de reacción con la glucosa, se tomó una alícuota de suspensión celular (800 µl) y se filtró por vacío en membranas de DVPP (0.65 µm de tamaño de poro) previamente humedecidas con medio Krebs-Ringer + 100 mM de glucosa. Posteriormente, las células colectadas en las membranas se lavaron por filtración con 15 ml de medio Krebs-Ringer + 100 mM de glucosa a 4 °C; este lavado se realizó con la finalidad de eliminar la glucosa unida de forma inespecífica en las células.

Las membranas se colocaron en viales PACKARD® de vidrio y se adicionaron 6 ml de líquido de centelleo. La determinación de las CPM totales se realizó tomando 10 µl de la suspensión celular radiactiva, la cual fue depositada en viales de vidrio y líquido de centelleo. Los viales se analizaron en el Contador de Centelleo PACKARD® y se determinaron las CPM emitidas por las células (indicativo de la glucosa marcada que fue transportada al interior de éstas).

El cálculo para la determinación de actividad de transporte de glucosa se realizó de la siguiente manera:

Actividad de GLUT estimulado con 0.5 mM de glucosa marcada:

Considerando: 0.8 mg de proteína celular, 22.5 µl glucosa adicionada del stock 18 mM, 30 segundos de exposición a la glucosa, 4730 CPM emitidas por la muestra y 9403 CPM totales del ensayo.

Cálculo:

$$\frac{18 \text{ nmol}_{\text{glu cos a}}}{\mu\text{l}} (22.5 \mu\text{l}_{\text{adicionados}}) = \frac{405 \text{ nmol}_{\text{glu cos a}} (10 \mu\text{l}_{\text{ensayo}})}{800 \mu\text{l}_{\text{totales}}} = 5.06 \text{ nmol}_{\text{glu cos a}}$$

$$\frac{5.06 \text{ nmol}_{\text{glu cos a}}}{9403 \text{ CPM}_{\text{total}}} = \frac{5.4 \times 10^{-4} \text{ nmol}_{\text{glu cos a}}}{\text{CPM}_{\text{total}}}$$

$$\frac{5.4 \times 10^{-4} \text{ nmol}_{\text{glu cos a total}}}{\text{CPM}_{\text{total}}} (4673 \text{ CPM}_{\text{muestra}}) = \frac{2.5 \text{ nmol}_{\text{glu cos a}}}{(0.5 \text{ min})(0.8 \text{ mg}_{\text{proteína total}})} = \frac{6.25 \text{ nmol}_{\text{glu cos a transportada}}}{(\text{min})(\text{mg}_{\text{proteína total}})}$$

5.9. Ensayos de inhibición y K_i sobre la actividad de GLUT.

La determinación de transporte de glucosa en presencia de inhibidor (citocalasina B ó floretina) se realizó según el protocolo descrito en el punto anterior. La exposición al inhibidor se realizó durante la preincubación de la suspensión celular de 10 min. Las concentraciones empleadas de inhibidor fueron de 0.25 a 2.5 µM para la citocalasina B y de 1 a 100 µM para la floretina. Las concentraciones de glucosa empleadas para estimular el transporte de glucosa fueron 1, 2.5 y 10 mM. La determinación del tipo de inhibición y K_i se realizaron por los métodos de Dixon y Cornish-Bowden.

5.10. Determinación de actividad de GLUT en presencia de insulina

La determinación de transporte de glucosa en presencia de insulina se realizó según el protocolo descrito en el punto 5.8. La exposición a la insulina se realizó durante la preincubación de la suspensión celular de 10 min y las concentraciones empleadas fueron de 0.1 a 1000 μ U/ml. Las concentraciones de glucosa empleadas para estimular el transporte de glucosa fueron 10 y 40 mM.

5.11. Determinación de actividad de GLUT en presencia de fructosa

La determinación de transporte de glucosa en presencia de fructosa se realizó según el protocolo descrito en el punto 5.8 con la modificación sobre la adición del sustrato como se describe a continuación: la fructosa (0 - 50 mM) se adicionó 3 segundos antes de la adición de la glucosa marcada. Las concentraciones de glucosa empleadas para estimular el transporte de glucosa fueron 1, 10 y 40 mM.

6. RESULTADOS

6.1. Implementación de la técnica experimental para la evaluación de la actividad de GLUT

6.1.1. Sistema de filtrado y lavado de células: elección de membranas

Se implementó un sistema de filtrado y lavado para las células expuestas a glucosa marcada. La característica principal de dicho sistema es la ausencia de retención de marca radiactiva por parte las membranas en las que las células son colectadas y lavadas. Considerando el tamaño promedio de las células AS-30D es de 1 μm , las pruebas se realizaron con membranas Millipore® de materiales como nitrocelulosa (0.2, 0.45, y 0.8 μm de tamaño de poro) y fibra de vidrio (0.8 μm de tamaño de poro). Ambas se descartaron por la alta retención inespecífica de marca radiactiva. En cambio, las membranas de DVPP (difluoruro de polivinilo, 0.65 μm de tamaño de poro) no interfirieron con la determinación de CPM emitidas por las células ya que la retención inespecífica de marca radiactiva fue despreciable.

6.1.2. Concentración de proteína celular necesaria para el ensayo de transporte

Se estableció la cantidad de proteína celular adecuada para cuantificar la glucosa radiactiva transportada por las células y determinar la actividad de GLUT. La figura 10 muestra el intervalo de proteína celular con la que se obtuvo una velocidad de transporte de glucosa lineal. Es importante mencionar que el límite de proteína empleada fue 0.8 mg/ml porque cantidades mayores aumentan la densidad celular impidiendo el lavado adecuado de las células.

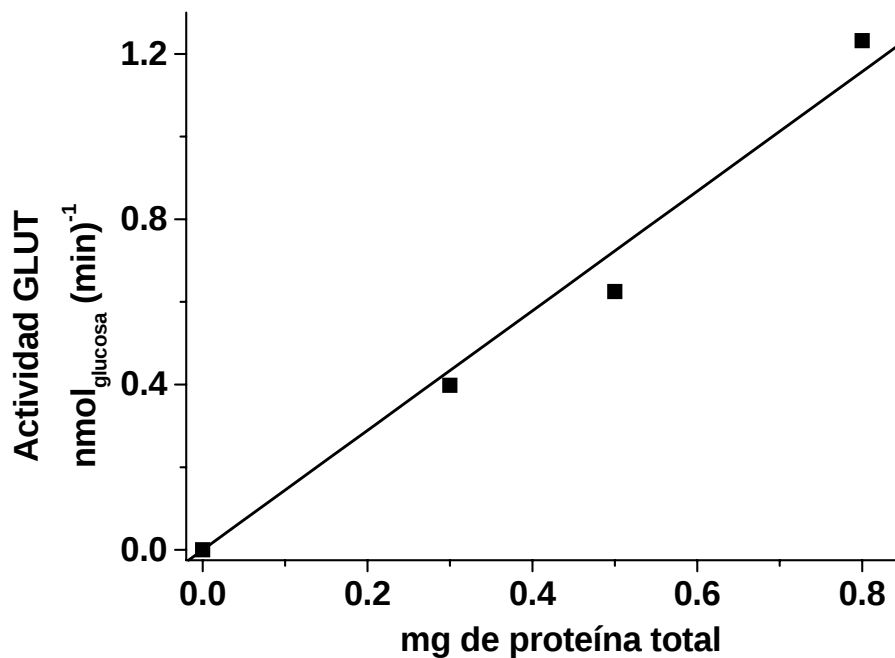


Figura 10. La velocidad de GLUT es lineal y constante de 0.1 a 0.8 mg de proteína. El ensayo se realizó a 15 °C y con una concentración de glucosa de 10 mM. Los puntos muestran una curva representativa de 3 ensayos independientes.

De lo anterior seleccionamos 0.8 mg de proteína total para determinar la velocidad del transporte de glucosa ya que esta cantidad de proteína permitió obtener valores cuantificables de CPM emitidas por las células y además está dentro del rango lineal para la determinación del transporte de glucosa.

6.1.3. Selección de las condiciones para determinar la velocidad inicial del transporte de glucosa

a) Temperatura de reacción e inactivación de la HK

El transporte de glucosa se cuantifica como la cantidad de glucosa transportada cuando el consumo de este carbohidrato por la HK es mínimo o despreciable. En células AS-30D, esta enzima se encuentra muy activa y por tanto puede interferir en la determinación de la actividad de transporte de GLUT, por lo que se decidió evaluar el efecto de la disminución de temperatura sobre la actividad de las dos isoformas de HK activas en AS-30D (citósólica y mitocondrial) en extractos celulares.

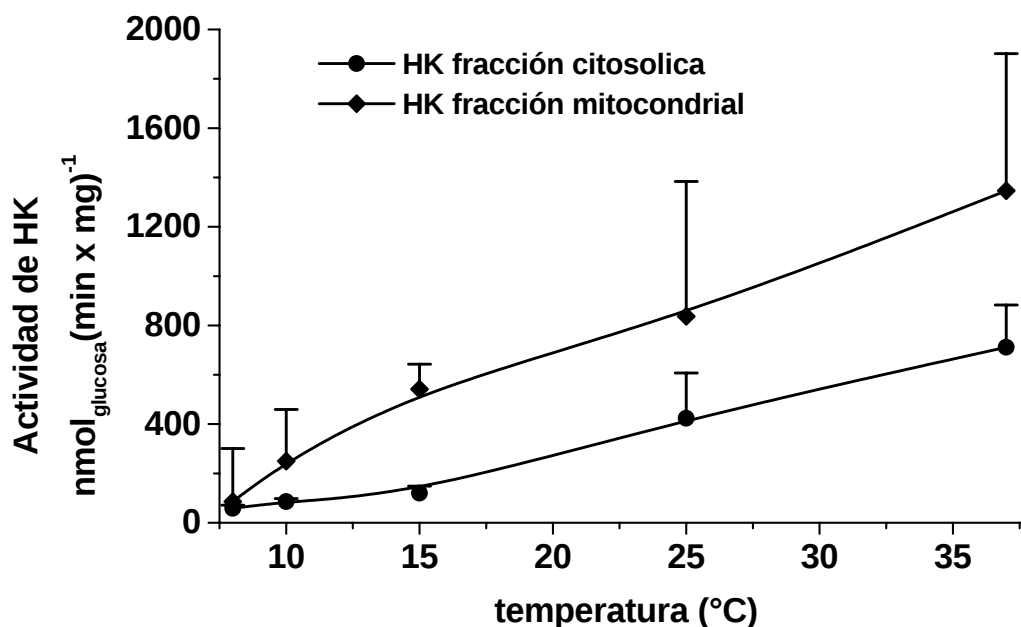


Figura 11. Efecto de la disminución de temperatura sobre la actividad de HK. Los puntos muestran el promedio de 4 muestras independientes $\pm$ DE.

Además de esta considerable disminución en la actividad en ambos tipos de HK, el tiempo de respuesta o latencia de reacción incrementó al disminuir la temperatura (figura 12).

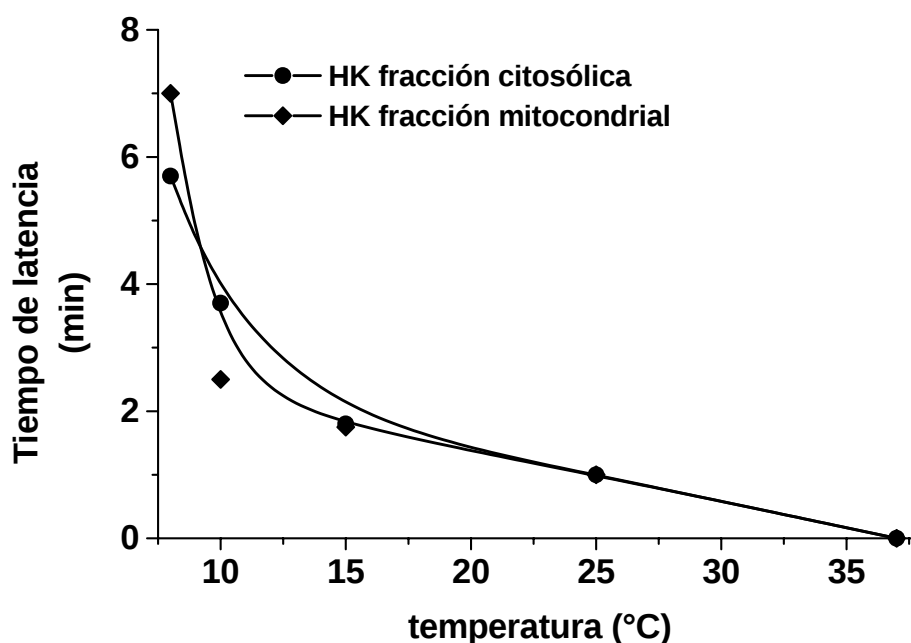


Figura 12. El tiempo de latencia (tiempo de respuesta de la HK) aumentó proporcionalmente al disminuir la temperatura. Los puntos muestran una curva representativa de 4 ensayos independientes.

Considerando la disminución de la actividad de la HK y el incremento en el tiempo de latencia, se eligieron las temperaturas de 15 y 25 °C para determinar la actividad de GLUT.

Se eligió 15°C como temperatura mínima porque en esta condición la actividad de la HK en la fracción citosólica disminuyó 80% (de $711 \pm 170 \text{ nmol (min x mg)}^{-1}$ a $120 \pm 29 \text{ nmol (min x mg)}^{-1}$) y en la fracción mitocondrial disminuyó 62 % con respecto a la actividad determinada a 37 °C (de $1346 \pm 556 \text{ nmol (min x mg)}^{-1}$ a

$600 \pm 101 \text{ nmol (min x mg)}^{-1}$). Además se eligió como temperatura máxima 25°C con la finalidad de obtener el conjunto de valores necesarios para calcular el coeficiente de temperatura Q_{10} , que nos permitió estimar la actividad de GLUT a 35°C .

b) Temperatura de reacción y disminución de la velocidad de glucólisis

Se cuantificó la velocidad de glucólisis y la concentración de G6P en células aisladas de AS-30D para demostrar que como consecuencia de la disminución de la actividad de la HK, la velocidad de glucólisis se encontraba disminuida a las temperaturas empleadas para la determinación de la actividad de GLUT. La glucólisis disminuyó 90% de 37°C a 15°C , e interesantemente la concentración de G6P se mantuvo significativamente constante como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Efecto de la disminución de temperatura sobre la glucólisis y la concentración de glucosa-6-fosfato en células AS-30D

Temperatura $^{\circ}\text{C}$	V de glucólisis $\text{nmol}_{\text{lactato}} (\text{min x mg})^{-1}$	G6P nmol (mg)^{-1}
15	$2.2 \pm 1.7 (3)$	$10.9 \pm 5.2 (3)$
37	$24.8 \pm 3.2 (4)$	$7.1 \pm 2.9 (3)$

Sin embargo; aún cuando la concentración de G6P se mantuvo constante, la actividad de la HK y la velocidad de glucólisis se encontraron significativamente bajas con la disminución de temperatura.

6.1.4. Selección del tiempo de reacción

Para determinar la actividad de GLUT en condiciones de velocidad inicial evaluamos el incremento lineal en la actividad con respecto al tiempo a 15 °C y a 25 °C con 0.8 mg de proteína celular. En ambos casos la velocidad se incrementó de manera lineal hasta 30 segundos y a tiempos mayores se mantuvo constante. Por lo tanto, consideramos el intervalo de tiempo de 0 a 30 segundos como velocidad inicial (figura 13).

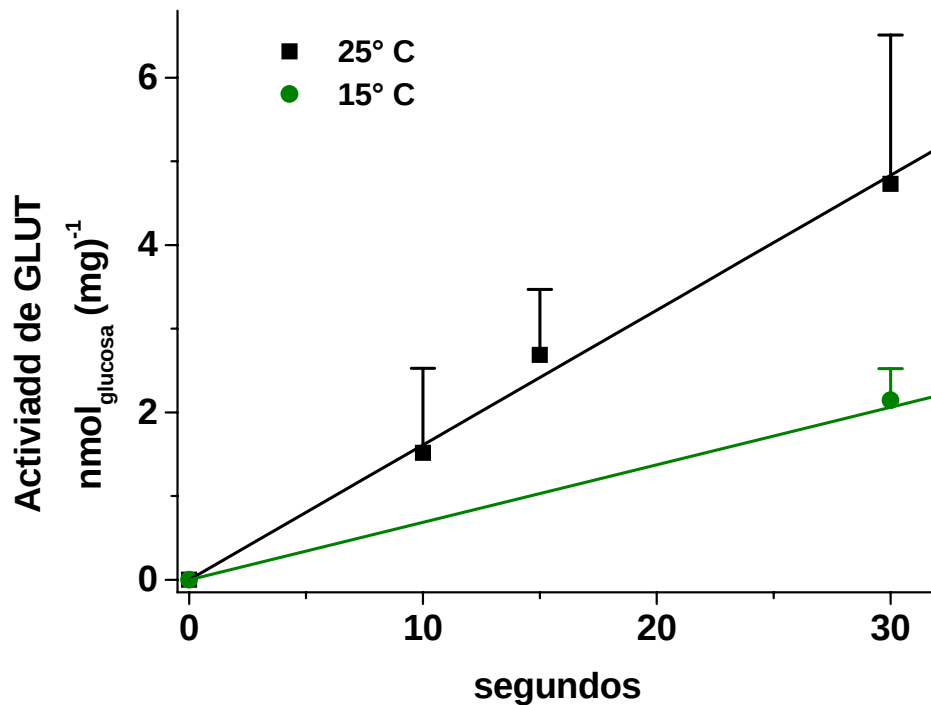


Figura 13. Linealidad del transporte de glucosa. Los puntos muestran el promedio de 3 experimentos independientes $\pm$ DE.

En las subsecuentes determinaciones de la actividad de GLUT evaluamos la velocidad de transporte en el intervalo de linealidad (15 y a 30 segundos) a la concentración requerida de glucosa, y reportamos el promedio de ambas determinaciones. Esta doble determinación fue un control interno de la estabilidad del sistema en muestras independientes.

6.2. Evaluación de la actividad de GLUT: determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_m

Una vez implementada la técnica para medir el transporte de glucosa en condiciones de velocidad inicial, determinamos los parámetros cinéticos K_m y V_m de GLUT en células aisladas de AS-30D y comparamos los valores con los reportados por otros investigadores en diferentes tipos de células (ver apartado de Discusión).

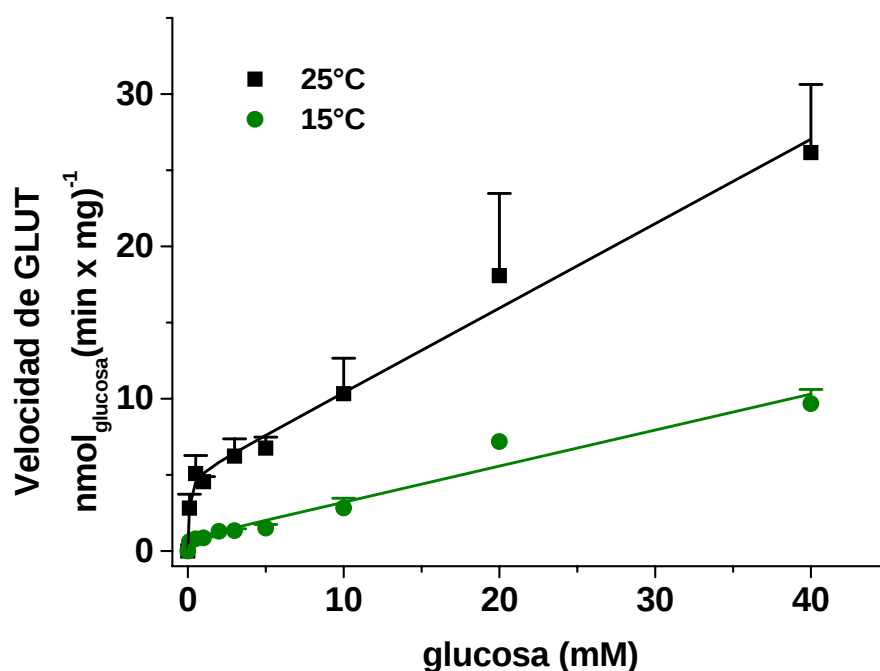


Figura 14. Cinética de transporte de glucosa a 15 y 25°C. Los puntos muestran el promedio de 4 preparaciones independientes $\pm$ DE.

En la tabla 10 se muestran los parámetros cinéticos (K_m , constante de afinidad por sustrato y V_m , velocidad máxima) determinados a 15 °C y a 25 °C. El análisis de los valores encontrados nos permitió estimar un valor de V_m a 35 °C, (condición cercana a la temperatura fisiológica de 37 °C) a partir del coeficiente de temperatura (Q_{10}). El coeficiente de temperatura Q_{10} es utilizado con frecuencia para expresar dependencia a la temperatura en reacciones químicas, físicas y/o biológicas y se define como el factor de incremento en la velocidad de un proceso cuando se presenta un aumento de la temperatura de 10 °C (Pastakia & Dwyer, 1987).

El valor de Q_{10} se obtuvo del siguiente análisis: se comparó la V_m del primer componente a 15 °C [0.75 ± 0.34 nmol (min x mg)⁻¹], con el incremento de la V_m a 25 °C [5.1 ± 0.8 nmol (min x mg)⁻¹]. Este incremento fue de 6.8 veces, que por definición corresponde al valor de Q_{10} para la enzima evaluada (Belehra'dek, 1935). Por lo tanto, el valor de V_m a 35 °C [34.4 ± 5.1 nmol (min x mg)⁻¹] se determinó multiplicando el valor de V_m a 25 °C por 6.8. El valor de K_m es el promedio de los valores obtenidos a cada temperatura de trabajo.

Tabla 10. Parámetros cinéticos K_m y V_m de GLUT en células AS-30D

T °C	V_m nmol _{glucosa} (min x mg) ⁻¹	K_m mM
15	0.75 ± 0.34 (3)	0.27 ± 0.05 (3)
25	5.1 ± 0.8 (3)	0.13 ± 0.10 (3)
	Considerando $Q_{10}=6.8$	
35	34.4 ± 5.1	0.2 ± 0.07
	6.3 nmol(min x 10 ⁶ cels) ⁻¹	

6.3. Cinética de GLUT: ajuste a hipérbola más un componente lineal.

Los valores de actividad de la cinética de GLUT generaron un gráfico de tipo no hiperbólico que fue analizado empleando diferentes ajustes (figura 15) que describen la actividad de dos componentes en una cinética. Los ajustes fueron: a) cinética hiperbólica + un componente lineal, b) cinética de doble hipérbola y c) cinética de doble Hill. En cada ajuste se consideraron los valores de actividad promedio de 4 preparaciones independientes para cada punto de la cinética de transporte de glucosa a 25 °C (figura 14).

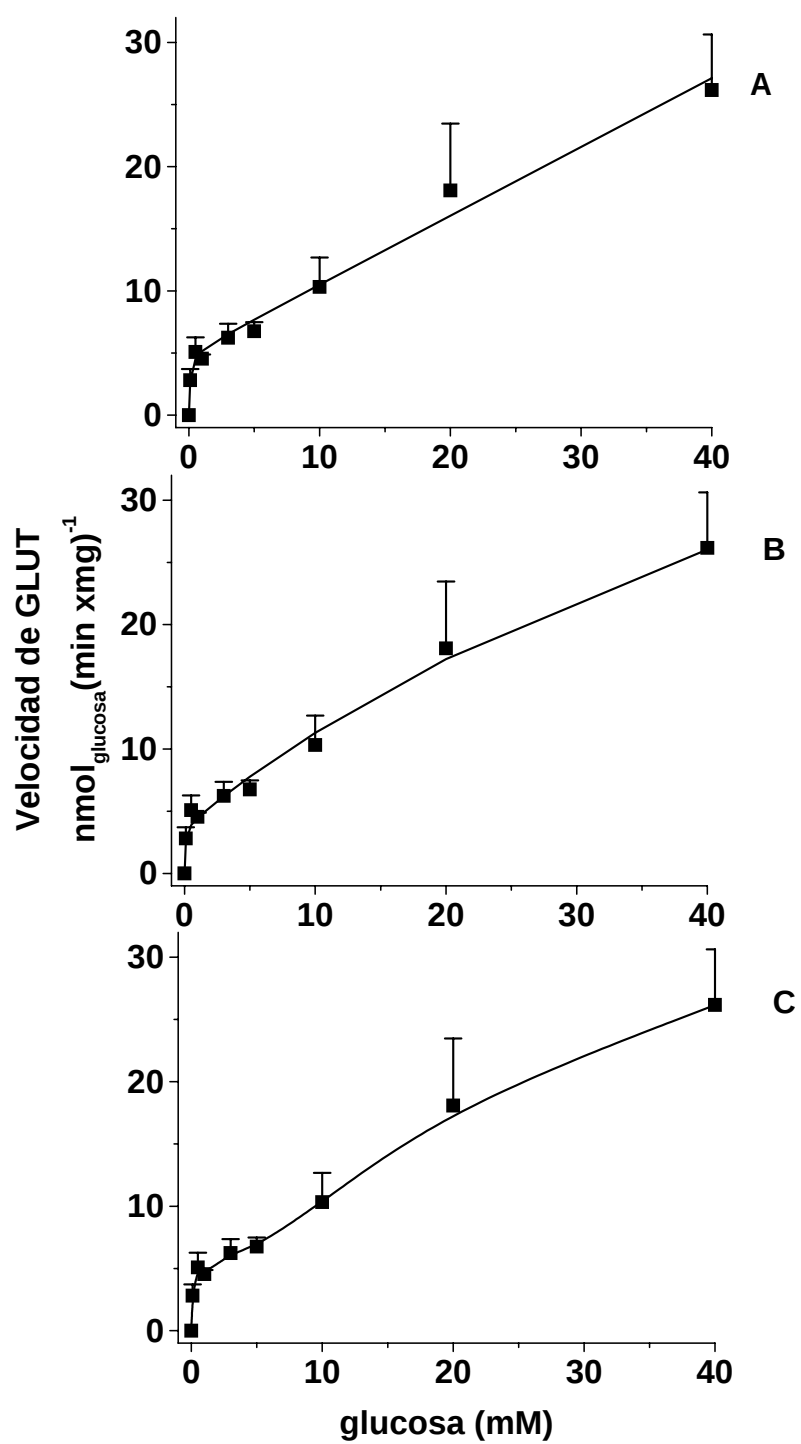


Figura 15. A) Ajuste a cinética hiperbólica + un componente lineal, B) ajuste a cinética de doble hipérbola y C) ajuste a cinética doble Hill.

El criterio empleado para elegir el ajuste que describe con mayor precisión la cinética de transporte de glucosa fue la comparación entre el valor de Chi^2 y los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los ajustes realizados a la cinética de GLUT a 25 °C. Al comparar el valor de Chi^2 , el valor que más se aproxime a cero indica que los resultados experimentales se ajustan con mayor precisión a la distribución teórica esperada; considerando además el mejor ajuste aquel con el menor número de parámetros cinéticos y con el valor de DE menos significativo entre cada uno de ellos.

Tabla 11. Parámetros cinéticos del transporte de glucosa.

Cinética hiperbólica + componente lineal	Cinética de doble hipérbola	Cinética de doble Hill
Chi^2 1.12	Chi^2 1.30	Chi^2 0.23
Vm_1 5 ± 0.6	Vm_1 3.8 ± 1.2	Vm_1 5.7 ± 1.1
Km_1 0.09 ± 0.08	Km_1 0.09 ± 0.15	$K_{s_1}^{n1}$ 0.10 ± 0.05
m 0.55 ± 0.03	Vm_2 54 ± 19	$n1$ 1 ± 0.70
	Km_2 57 ± 36	Vm_2 26 ± 4
		$K_{s_2}^{n2}$ 20 ± 2
		$n2$ 2 ± 0.4

La DE en cada caso es la obtenida del ajuste.

Donde:

Vm_1 = Velocidad máxima de la enzima 1

Vm_2 = Velocidad máxima de la enzima 2

Km_1 = K_m de la enzima 1

Km_2 = K_m de la enzima 2

m = velocidad de la enzima 2

$K_{s_1}^{n1}$ = Constante de disociación intrínseca de la enzima 1

$K_{s_2}^{n2}$ = Constante de disociación intrínseca de la enzima 2

$n1$ = número de dominios o sitios de unión para el sustrato de la enzima 1

$n2$ = número de dominios o sitios de unión para el sustrato de la enzima 2

De acuerdo a los criterios descritos en el párrafo anterior, determinamos que el ajuste mas adecuado es la cinética hiperbólica más un componente lineal, ya que aun cuando el valor de χ^2 es alto (1.12), el número de parámetros cinéticos y la DE entre ellos fue menor comparado con los otros ajustes. En este tipo de cinética, el primer componente (enzima 1) tiene un comportamiento hiperbólico, mientras que el segundo componente (enzima 2) tiene un comportamiento lineal (figura 16).

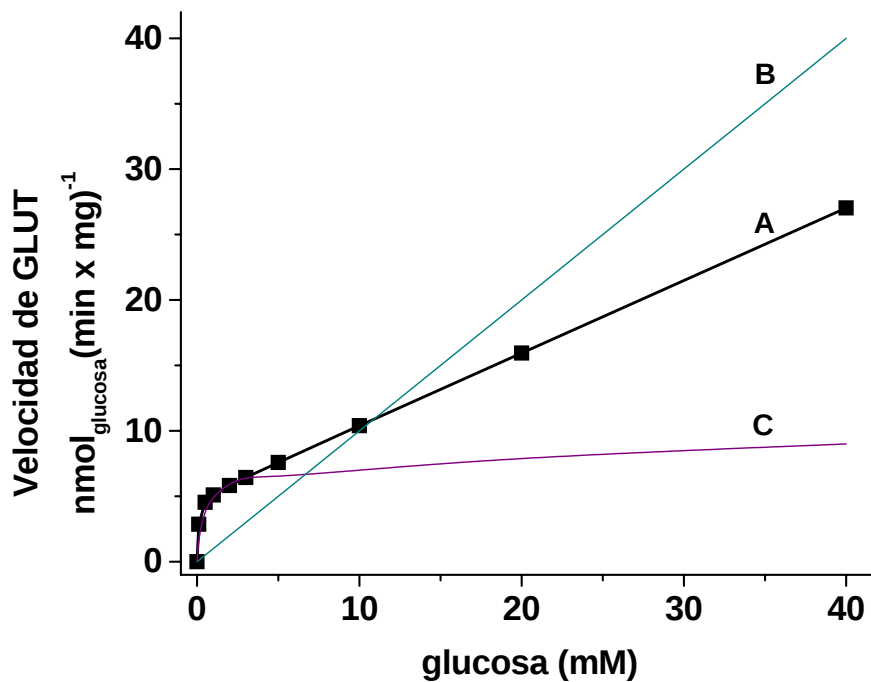


Figura 16. A) Cinética de transporte de glucosa a 25°C, B) representación esquemática del componente con cinética lineal, C) representación esquemática del componente con cinética hiperbólica.

La actividad de los componentes involucrados en la cinética de transporte de glucosa se evidenció como un cambio en el valor de la pendiente sobre el gráfico de los recíprocos de velocidad y concentración de sustrato a 25 °C (figura 17), ya que en vez de obtener una línea recta como ocurriría al evaluar a una sola enzima se obtiene una línea recta con dos cambios de pendiente.

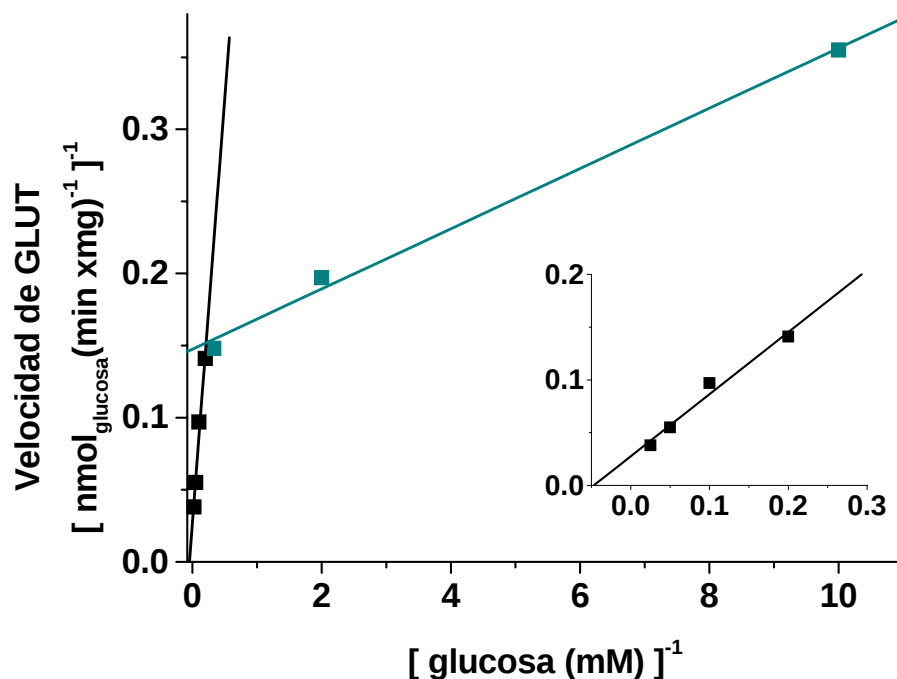


Figura 17. Gráfico de dobles recíprocos. El inserto representa con detalle la cinética a concentraciones bajas de glucosa.

6.4. Sensibilidad del transporte de glucosa a inhibidores de GLUT

6.5. Citocalasina B

En la figura 18 se muestran las curvas de inhibición obtenidas al titular la velocidad de GLUT con concentraciones crecientes de citocalasina B a 15 °C y a 25 °C en presencia de 10 mM de glucosa. De estos gráficos se obtuvo la

concentración a la cual el inhibidor disminuyo al 50% la actividad de la enzima (IC_{50}).

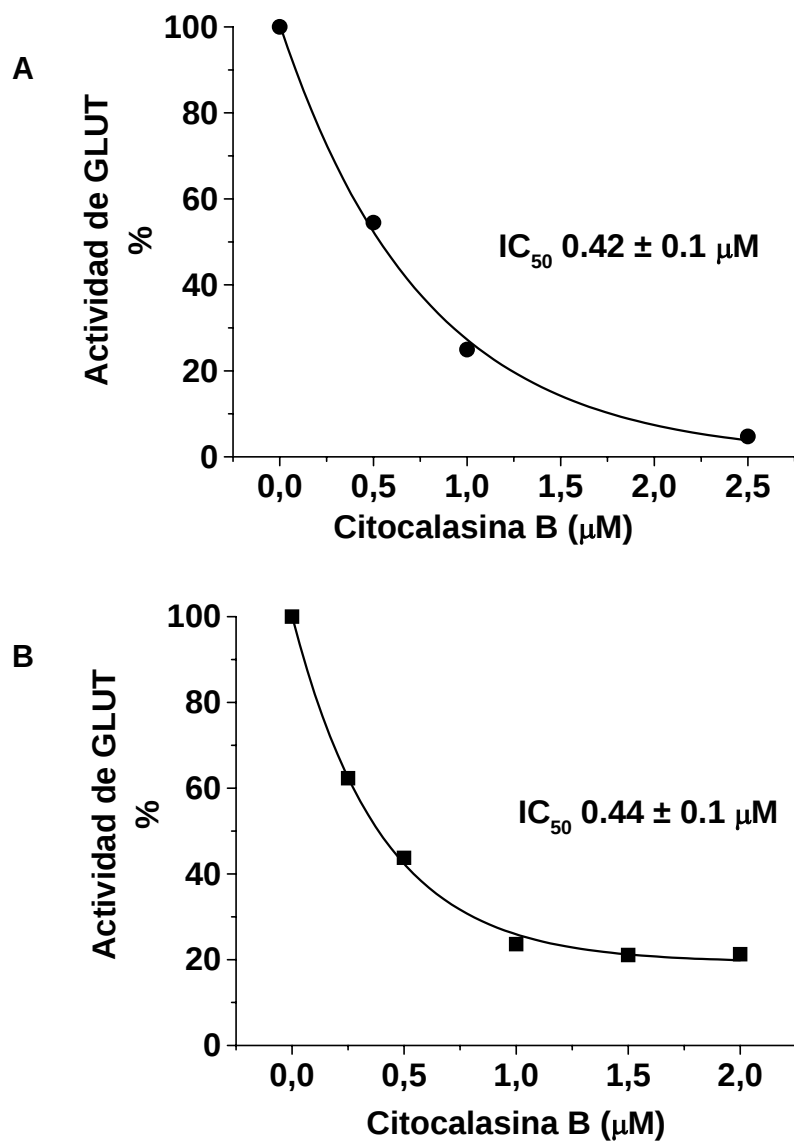


Figura 18. Determinación de IC_{50} por citocalasina B del transporte de glucosa a 15 °C (A) y 25 °C (B). El ensayo se realizó con una concentración de glucosa de 10 mM. El ensayo es una curva representativa de 4 preparaciones independientes.

La determinación de IC_{50} se realizó en presencia de 10 mM de glucosa a 15 y 25 °C para evaluar la velocidad de transporte del primer componente de la cinética de GLUT (ver figura 14). La transición de temperatura no afectó la unión del inhibidor al GLUT debido a que los valores de IC_{50} fueron semejantes ($0.42 \pm 0.1 \mu\text{M}$ a 15 °C y $0.44 \pm 0.1 \mu\text{M}$ a 25 °C). Para determinar el tipo de inhibición que ejerce la citocalasina B sobre el transporte de glucosa se emplearon concentraciones de glucosa a 1, 2.5 y 10 mM que comprende la activación del primer componente de la cinética de GLUT. La figura 19 muestra los gráficos de Dixon para la determinación del tipo de inhibición.

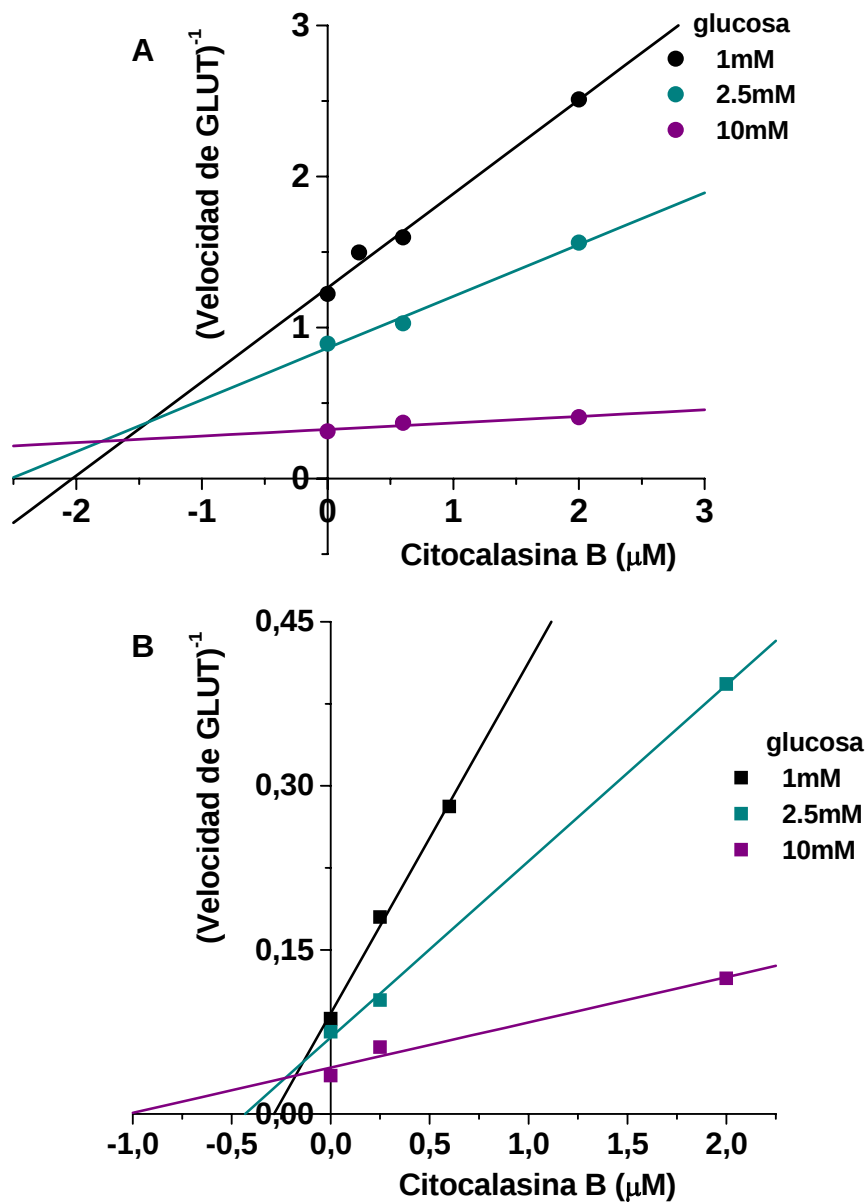


Figura 19. Análisis de Dixon de la actividad de GLUT en presencia de citocalasina B a 15 °C (A) y 25 °C (B).

Los gráficos de Dixon mostraron que la citocalasina B inhibió la actividad de GLUT por dos posibles vías: competitivamente o de forma mixta. Este tipo de análisis es incompleto ya que no permite distinguir la inhibición de tipo

competitivo de la inhibición de tipo mixto (Schlamowitz, Shaw, & Jackson, 1969) lo que sugirió emplear análisis adicional para identificar con claridad el tipo de inhibición que ejerce la citocalasina B. Para ello se utilizó la aproximación de Cornish-Bowden (figura 20) que considera la relación *sustrato/velocidad* con respecto a la concentración de inhibidor. Esta consideración permite distinguir el efecto de cada tipo de inhibidor por las diferencias gráficas que se obtienen en cada caso (Cornish-Bowden, 1974). Aplicando este análisis se determinó que la citocalasina B es un inhibidor de tipo competitivo.

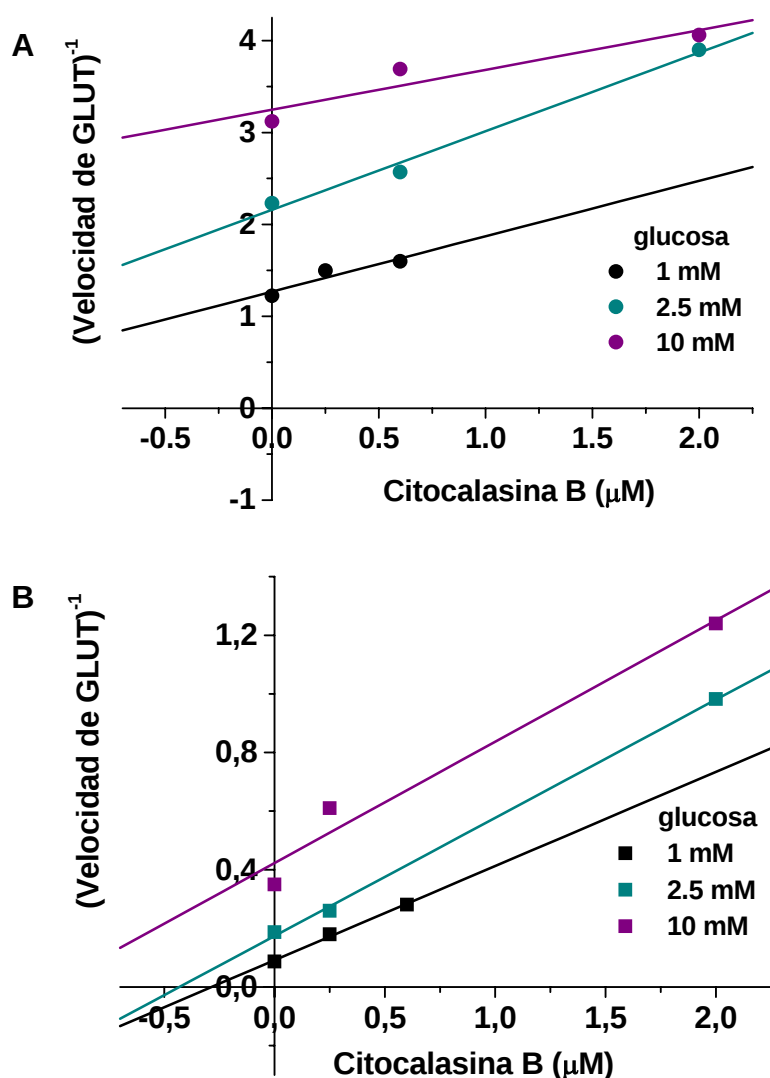


Figura 20. Análisis de Cornish-Bowden de la actividad de GLUT en presencia de citocalasina B a 15 °C (A) y 25 °C (B).

Tabla 12. Inhibición de la actividad de GLUT por citocalasina B.

Citocalasina B		
	IC_{50}	K_i
15°C	0.42 ± 0.1	0.81 ± 0.6
25°C	0.44 ± 0.1	0.30 ± 0.1

n=3; IC_{50} y K_i se expresan en (μ M).

Aunque aparentemente la K_i aumenta de 0.81 μ M a 0.3 μ M de 15 °C a 25 °C, este aumento no resultó significativo al comparar la desviación estándar de los valores obtenidos con una $P < 0.005$ (prueba t-Student para muestras independientes). Esto indica que el valor de K_i se mantiene constante al evaluar la actividad de GLUT a ambas temperaturas.

Cabe mencionar que la DE obtenida en la determinación de K_i a 15°C es muy grande, lo cual implica que es necesario realizar mas determinaciones para asegurar que los resultados obtenidos sean consistentes.

6.6. Floretina

En la figura 21 se muestran las curvas de inhibición obtenidas al titular la velocidad de GLUT con concentraciones crecientes de floretina a 15 °C y a 25 °C. La determinación de IC_{50} se realizó en presencia de 10 mM de glucosa a 15 y 25 °C para evaluar la velocidad de transporte del primer componente de la cinética de GLUT (figura 14).

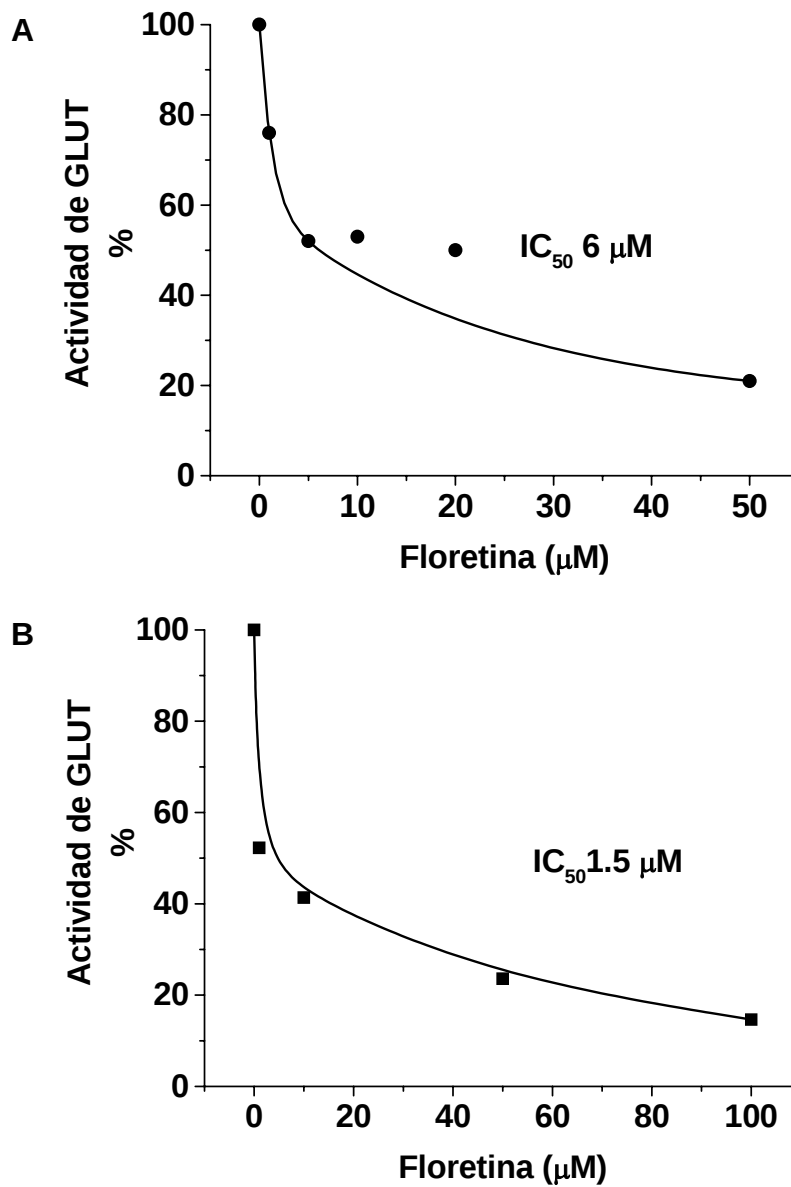


Figura 21. Determinación de la IC_{50} de floretina estimulando el GLUT con 10 mM de glucosa exógena a 15 °C (A) y 25 °C (B). Cada gráfico es una curva representativa de 3 preparaciones independientes.

Tabla 13. Efecto de la temperatura sobre la inhibición de GLUT por floretina

Floretina	
	<i>IC₅₀</i>
15°C	5.6 ± 3
25°C	16 ± 8

n=3; IC₅₀ se expresa en (μM).

Contrario a la inhibición de la actividad de GLUT por citocalasina B, los valores de *IC₅₀* por floretina a 15 °C fueron aproximadamente 3 veces menores que a 25 °C probablemente debido al efecto de la temperatura en la unión del inhibidor al GLUT.

6.7. Efecto de la insulina sobre el transporte de glucosa

Para determinar la presencia de GLUT 4 en el hepatoma AS-30D se evaluó la actividad de GLUT en presencia de insulina a concentraciones fisiológicas (15 ± 5 μU/ml en humanos y en rata (Bagdade, Bierman, & Porte, 1967)).

Para evaluar al componente hiperbólico de la cinética de GLUT se empleó glucosa 10 mM (figura 11 y 13) y para evaluar el componente lineal se empleó 40 mM de glucosa. En ambos casos las células AS-30D fueron expuestas a insulina a diferentes concentraciones durante 10 y 30 min para descartar que el tiempo de incubación fuera un factor limitante en la activación del transportador de glucosa. Sin embargo, la actividad de GLUT bajo estas condiciones no se modificó.

Tabla 14. Efecto de la insulina sobre la actividad de GLUT para el componente hiperbólico de la cinética de GLUT.

Insulina ($\mu\text{U/ml}$)	$V \text{ nmol (min x mg)}^{-1}$	
	10 min	30 min
0	10.9	7.9
0.1	9.0	ND
10	11.7	7.5
100	10.8	7.0
1000	12.6	ND

Los resultados muestran el promedio dos muestras independientes. GLUT se estimuló con glucosa 10 mM; ND, No determinado.

Tabla 15. Efecto de la insulina sobre la actividad de GLUT para el componente lineal de la cinética de GLUT.

Insulina ($\mu\text{U/ml}$)	$V \text{ nmol (min x mg)}^{-1}$	
	10 min	30 min
0	26.3	25.8
10	24.8	25.4
1000	20.6	28.8

Los resultados muestran el promedio dos muestras independientes. GLUT se estimuló con glucosa 40 mM

Los resultados anteriores indicaron que GLUT4 probablemente no se expresa en las células AS-30D, o bien que es poco sensible a los cambios en insulina y

requiere concentraciones y/o tiempos de incubación mayores a las condiciones evaluadas en este trabajo. Una estrategia para determinar cual de estas posibilidades es la real se requiere hacer un análisis de Western Blot para identificar o descartar la expresión de GLUT 4.

6.8. Competencia del transporte de glucosa por fructosa

Se determinó el efecto de la fructosa sobre el transporte de glucosa con el objetivo de identificar si las células AS-30D son capaces de transportar otras hexosas además de glucosa, y revelar la probable presencia de GLUT 5. Se emplearon concentraciones de glucosa de 1 mM, 10 mM y 40 mM para evaluar ambos componentes de la cinética. En la tabla 16 se muestran los valores de velocidad del transporte de glucosa en presencia de diferentes concentraciones de fructosa.

Tabla 16. Efecto de la fructosa sobre la actividad de GLUT estimulado por glucosa.

Glucosa (mM)	V nmol (min x mg) ⁻¹			
	0	10*	20*	50*
1	4.6 ± 0.33 (3)	4.3 (2)	3.4 (2)	5.2 (2)
10	10.3 ± 2.4 (3)	11.2 (2)	7.8 (2)	7.5 (2)
40	26.1 ± 4.5 (3)	21.5 (2)	18.8 (2)	15.1 (2)

* Concentración de fructosa (mM), El ensayo se realizó a 25 °C. El número de preparaciones se muestran entre paréntesis.

La actividad de GLUT a concentraciones crecientes de fructosa (10-50 mM) y a concentraciones de glucosa menores de 40 mM no se modifica, únicamente cuando la concentración de glucosa es muy alta (40 mM), la actividad de GLUT disminuye sugiriendo una posible competencia de la fructosa por glucosa, que sin embargo no resulta de interés clínico por las altas concentraciones de glucosa y fructosa a las que se exponen las células.

6.9. Extensión del estudio de actividad de GLUT en otras líneas tumorales de interés clínico: HeLa

6.9.1. Cinética de transporte de glucosa en células HeLa

Este apartado se justifica por el interés de extender el estudio de la actividad de GLUT en células tumorales y establecer criterios de comparación entre líneas tumorales con diferente grado de malignidad y velocidad de proliferación que nos permitan comparar y definir la importancia que juega el GLUT en el control de la glucólisis tumoral. Se eligió la línea tumoral HeLa proveniente de cultivo bidimensional ya que es una línea tumoral humana ampliamente estudiada con gran interés clínico.

Previamente a la determinación de la actividad de GLUT en células tumorales HeLa, se seleccionaron las condiciones de velocidad inicial con respecto al tiempo y temperatura. El tiempo de reacción elegido fueron 6 seg y la temperatura 37 °C. Determinamos que la cinética de actividad de GLUT en células HeLa aparentemente es de tipo hiperbólico hasta 20 mM de glucosa, y a concentraciones de 20 a 40 mM es de tipo lineal (figura 22), sin embargo los datos fueron ajustados a una cinética hiperbólica.

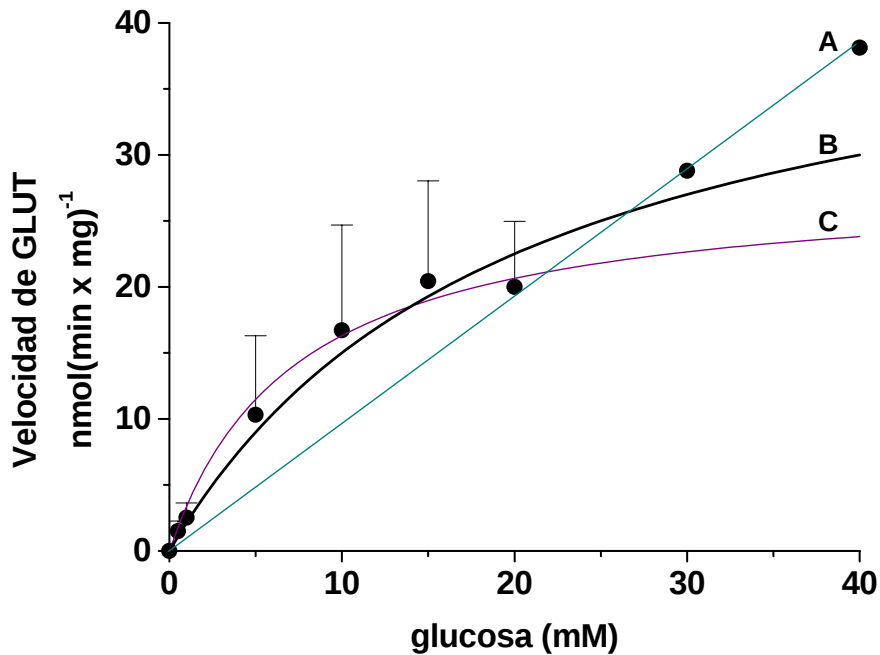


Figura 22. B) Cinética de transporte de glucosa a 37°C, A) representación esquemática del componente de la cinética lineal, C) representación esquemática del componente con la cinética hiperbólica. Los puntos muestran el promedio de 3 preparaciones independientes.

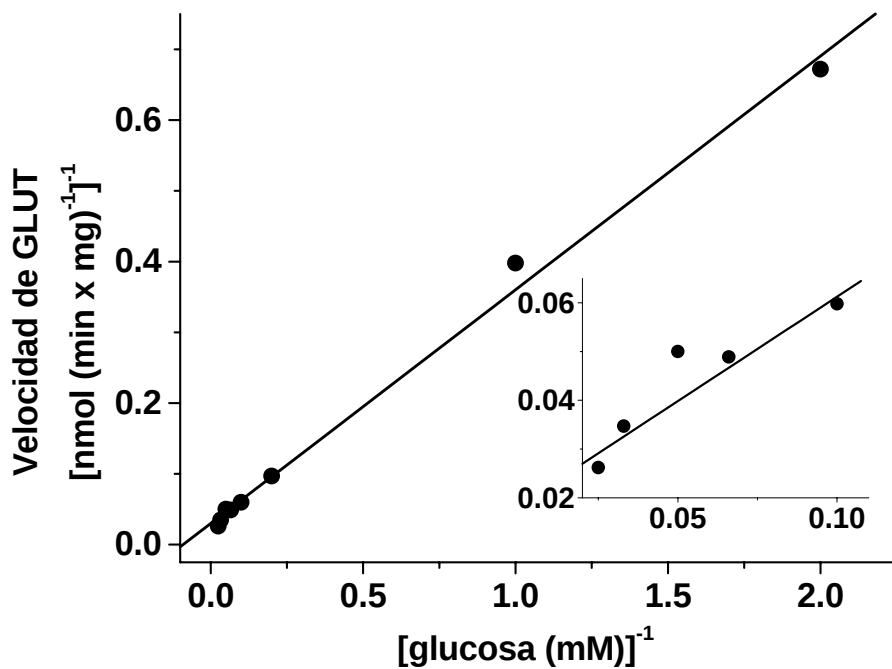


Figura 23. Gráfico de dobles recíprocos. El inserto representa con detalle la cinética a concentraciones bajas de glucosa.

Cabe mencionar que el ajuste a una cinética hiperbólica se realizó debido a que la DE obtenida con los resultados preliminares permitió ajustar únicamente a este tipo de cinética. Por lo tanto es necesario tener más ensayos de actividad en diferentes preparaciones de células.

Los parámetros cinéticos a 37 °C obtenidos (K_m y V_m) de este ajuste se muestran en la tabla 17:

Tabla 17. Parámetros cinéticos de la actividad de GLUT en células HeLa

	V_m $\text{nmol}_{\text{glucosa}}(\text{min} \times \text{mg})^{-1}$	K_m (mM)
37°C	49.5 ± 8.7	20 ± 7.5
	$8.9 \text{ nmol}(\text{min} \times 10^6 \text{ cels})^{-1}$	

Estos resultados son comparables con los reportes de actividad de GLUT para otros tipos de células tumorales (ver tabla 18).

6.9.2. Sensibilidad de GLUT a citocalasina B en células HeLa

Determinamos la sensibilidad del transporte de glucosa a citocalasina B en células HeLa. El ensayo preliminar reveló que la inhibición de GLUT en las células HeLa ocurre en el rango de concentraciones determinadas para la IC_{50} en el hepatoma AS-30D (figura 24).

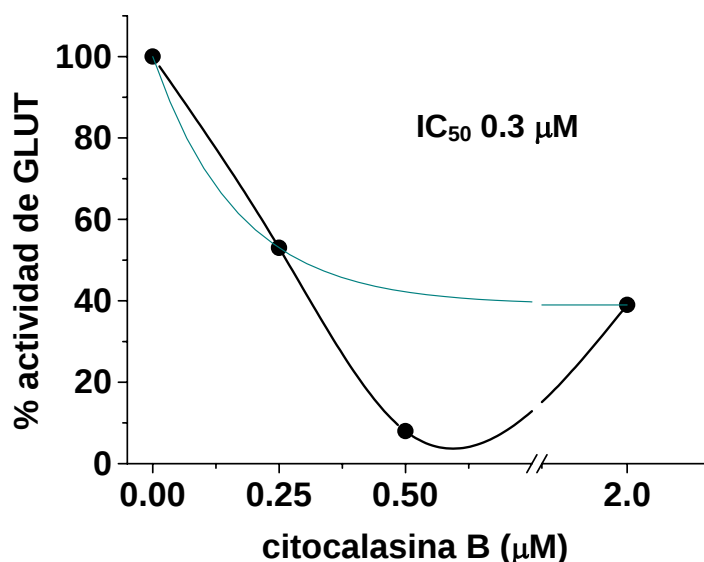


Figura 24. Inhibición de la actividad de GLUT estimulado con 10 mM de glucosa exógena a 37 °C. La línea azul representa la tendencia de inhibición sin considerar el punto de 0.5 μM de CB.

Estos resultados preliminares muestran que es necesario extender el abanico de concentraciones de CB hasta dentro del que se observó inhibición del transporte con la finalidad de obtener los la IC_{50} y posteriormente establecer las condiciones para determinar la K_i en células HeLa.

6.9.3. Identificación de las isoformas de GLUT presentes en el hepatoma AS-30D y en las células HeLa

Realizamos algunos ensayos preliminares de Western Blot con anticuerpos policlonales para GLUT 1 y GLUT 2 en ambas células, que revelaron que en el hepatoma AS-30D se expresa únicamente la isoforma GLUT 1 y en HeLa se expresan GLUT 1 y GLUT 2.

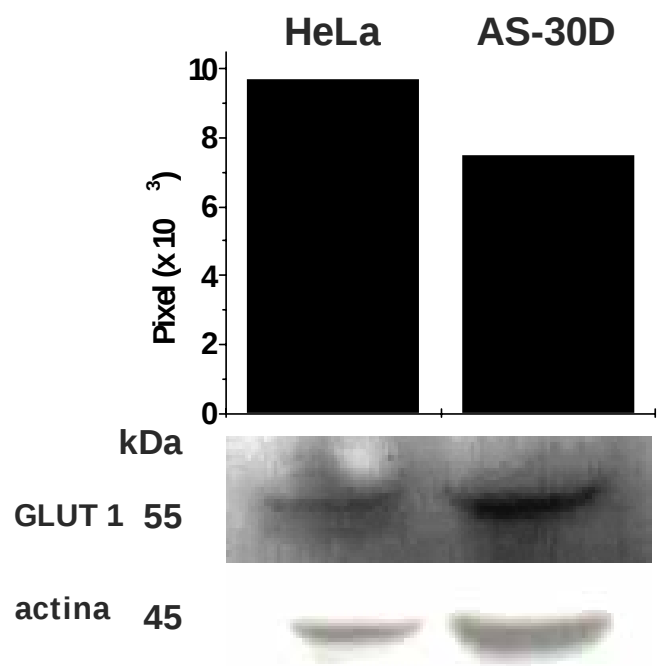


Figura 25. Expresión de GLUT 1 en células AS-30D y HeLa.

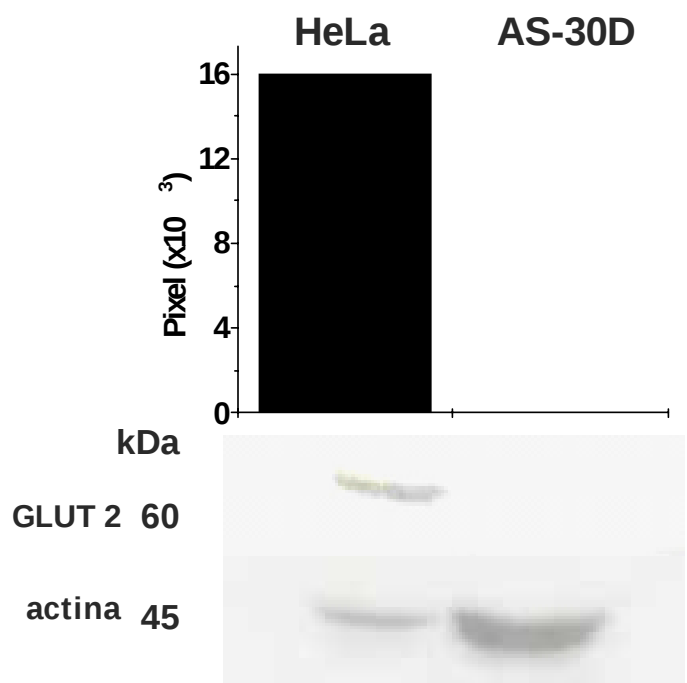


Figura 26. Expresión de GLUT 2 en células AS-30D y HeLa.

La técnica empleada para realizar el Western Blot (descrita por Tran, et al., 1999) fue modificada de la siguiente manera: la tinción de Amido negro no fue realizada y la composición del buffer de lisis para la obtención de los extractos de proteína total de ambas células fue modificado (ver apartado: Preparación de extractos celulares).

En ambos casos se utilizó actina como control de carga. Los resultados mostrados en las figuras 25 y 26 indican que la carga de proteína membranal en AS-30D fue casi tres veces mayor que HeLa. Aun con esta diferencia, el revelado del Western Blot por actividad mostró que en ambas células esta presente la isoforma GLUT 1. Para la isoforma GLUT 2 es claramente visible que esta no esta presente en AS-30D, aún cuando la cantidad de proteína membranal empleada es mayor que para HeLa.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Las metodologías comúnmente empleadas para la determinación de la actividad de GLUT han sido de gran utilidad para estimar la actividad del transportador de glucosa en diferentes tipos de células con diferentes fines, ya sea para identificar la presencia del transportador o bien para establecer diferencias en afinidad y capacidad (en términos de V_m) entre las diferentes isoformas de GLUT presentes en la célula. Sin embargo; cuando se busca realizar una comparación rigurosa entre los valores de actividad determinados para el GLUT y la actividad de cualquier otra enzima glucolítica, los resultados obtenidos con estas metodologías limitan la comparación estricta ya que las condiciones de los ensayos no son en velocidad inicial y generalmente se emplean análogos de glucosa como la 2-DOG, la 6-DOG o la 3-OMG sin contemplar que la afinidad del transportador de glucosa por estos sustratos puede diferir en menor o mayor grado con respecto a la afinidad por glucosa. Además, en estos ensayos no se contempla la participación de la HK que es capaz de metabolizar a los análogos como la 2-DOG (Rutter & Brosemer, 1961) y la 3-OMG (Cortés, et al. 2003).

La metodología para cuantificar la actividad de transporte de glucosa en las células AS-30D desarrollada en este trabajo posee ventajas con respecto a muchas de las metodologías previamente descritas en la literatura, ya que consideró la evaluación de la actividad de GLUT en células aisladas de AS-30D en condiciones de velocidad inicial utilizando glucosa con marca radiactiva (2- H^3 -glucosa) como sustrato.

Las ventajas de realizar la determinación de la actividad de transporte de glucosa en condiciones de velocidad inicial son que se puede evaluar a la enzima en presencia de una concentración constante y relativamente baja de su

producto, en este caso la glucosa transportada al interior de la célula; lo que asegura que el producto no afecte significativamente la actividad de transportador en caso de que existiera inhibición por producto. Además, dado que la glucosa es metabolizada por las enzimas glucolíticas una vez que entra al interior de la célula, la determinación de la actividad a tiempos cortos (de 15 a 30 segundos) junto con la disminución de la temperatura a 15 y a 25 °C que abate la actividad de la HK hasta en un 80% (en el caso de la HK citosólica) e incrementa el tiempo de latencia de la reacción hasta casi dos minutos, disminuye la probabilidad de cuantificar la glucosa que ha sido metabolizada por la HK a G6P.

En los ensayos de inactivación, el abatimiento de la actividad de la HK por la disminución de temperatura de 37 °C a 15 °C se confirmó con la disminución de la velocidad de glucólisis obtenida al cuantificar la concentración de lactato como producto final de la vía. Como consecuencia de la disminución tanto en la actividad de la HK como en el flujo total de la vía, se esperaba que las concentraciones de los metabolitos intermediarios como la G6P se encontraran disminuidas. Sin embargo la concentración de G6P no disminuyó como cabría esperar, sugiriendo fuentes alternas para la generación de este metabolito. Una de estas fuentes alternas es la acumulación de G6P presente en la célula por la inhibición en la actividad de la G6PDH al disminuir la temperatura a 15 °C (Rzymowska, 1994) y por la actividad constante de la glucosa-6-fosfato isomerasa que es poco sensible a los cambios en la temperatura (Shakespeare & Buchanan, 1978). Por lo tanto, la determinación de la concentración de G6P no necesariamente refleja el abatimiento de la actividad de la HK.

La importancia de abatir la actividad de la HK e incrementar en el tiempo de latencia de la reacción durante la determinación del transporte de glucosa es que en AS-30D esta enzima se encuentra considerablemente muy activa en forma de HK tipo I y II (citosólica y unida a la membrana mitocondrial), y además está expuesta a concentraciones altas de su activador fisiológico la

fructosa-2,6-bifosfato (Marín-Hernández, et al., 2006). Si la HK se encuentra activa y metaboliza la glucosa durante la determinación de la actividad de GLUT, la consecuencia es la sobreestimación de la actividad de transporte ya que el método de cuantificación de la cantidad de glucosa transportada empleado en la metodología descrita en este trabajo no permite diferenciar entre la glucosa libre y la glucosa en forma de otros metabolitos como la G6P.

Una vez obtenidas las cinéticas de transporte de glucosa a 15 °C y a 25 °C, el hecho de que no se ajustaran a un comportamiento hiperbólico de tipo Michaelis-Menten, sugirió dos posibilidades: a) que la actividad de transporte de glucosa se debiera a la participación de dos sistemas de transporte o componentes con diferente afinidad por glucosa; o bien, b) que el GLUT presentara cooperatividad negativa, es decir que la unión de la glucosa a un dominio catalítico del transportador provocara que la afinidad del dominio adyacente disminuyera su afinidad el sustrato. Sin embargo, resulta difícil sustentar la segunda propuesta ya que en la literatura no hay reportes en donde se describa cooperatividad negativa en los transportadores de glucosa (Sultzman & Carruthers, 1999).

El primer sistema o componente de la cinética de transporte de glucosa se detectó a concentraciones crecientes de glucosa de 0 a 10 mM y el segundo componente se detectó a concentraciones de 10 mM a 40 mM. Para descartar que el incremento observado en la velocidad de transporte a concentraciones altas de sustrato fuese el producto de la unión inespecífica de glucosa a la membrana celular, se realizó un control de retención basal de glucosa por parte de las células y del sistema de filtrado a concentraciones crecientes de glucosa. Los valores obtenidos de este control fueron restados a cada determinación de transporte. Este tipo de comportamiento cinético para el transporte de glucosa se ha reportado en otros tipos de células como las células Ishikawa de cáncer humano endometrial (Medina, et al., 2004) y en microorganismos como

Trypanosoma brucei (Seyfang & Duszenko, 1991), aunque en ambos casos no se proporciona el análisis detallado de este tipo de comportamiento cinético.

Es importante mencionar el posible efecto que pueden tener las altas concentraciones de glucosa en la célula, ya que si bien se realizó el control de retención de unión inespecífica de sustrato a la membrana celular, no se monitoreó el posible efecto del estrés hiperosmótico al que se expuso a la célula al utilizar concentraciones de glucosa de hasta 40 mM. Ya que se ha documentado que las células tumorales responden al estrés hiperosmótico activando una gran cantidad de enzimas cinasas involucradas en la transmisión de diversas señales en la célula (Fischer, et al., 2004) y que por lo tanto modifican su metabolismo. Es por ello que el presente trabajo se centró en los resultados obtenidos para el primer componente de la cinética de glucosa en las células AS-30D; sin embargo, valdría la pena explorar si la actividad del segundo componente en la cinética de transporte se ve afectado por el estrés hiperosmótico, ya que de resultar importante permitiría identificar y caracterizar con mayor claridad al segundo componente de la cinética de transporte.

Como parte de la validación del protocolo desarrollado para cuantificar el transporte de glucosa en células AS-30D, se determinó la sensibilidad del transporte de glucosa a algunos de los inhibidores y activadores reportados en la literatura y además se realizaron ensayos de competencia por sustrato con fructosa. Los inhibidores empleados fueron citocalasina B y floretina (inhibidores no específicos para GLUT). En este punto es importante hacer notar que en el caso de la citocalasina B, las concentraciones empleadas en los ensayos de inhibición solo modifican la actividad de GLUT y por lo tanto la inhibición del transporte de glucosa no es consecuencia de los efectos colaterales que se presentan a concentraciones de 100 μ M a nivel celular como son la alteración de la morfología y la inhibición en la formación de filamentos de actina (Lin, Lin, & Flanagan, 1978).

Para la citocalasina B, en el hepatoma AS-30D la IC_{50} ($0.44 \pm 0.1 \mu\text{M}$) y la K_i ($0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$) se encontraron en el rango de los valores reportados para GLUT 1 en eritrocito (IC_{50} $0.5 \mu\text{M}$, K_i $0.4 - 0.6 \mu\text{M}$) evaluados con 2-DOG a 25°C (Griffin, Rampal, & Jung, 1982), para GLUT 2 (IC_{50} $7 \mu\text{M}$, K_i 7 mM) y GLUT 3 (IC_{50} $0.1 - 2 \mu\text{M}$, K_i 2 mM) sobreexpresados en *Xenopus laevis* y evaluados con 2-DOG a 18°C (Colville, et al., 1993) lo que indica que los valores reportados en este trabajo son comparables con los descritos en la literatura aún cuando en éstos se emplean análogos de glucosa como la 2-DOG, y sugieren que la identidad del primer componente de la cinética de glucosa es GLUT 1. Además, la evaluación cinética del primer componente reveló un tipo de inhibición competitiva al realizar el análisis de Cornish-Bowden (Cornish-Bowden, 1974) a 15 y 25°C respectivamente. Este tipo de inhibición se ha reportado únicamente para GLUT1 en eritrocito (Griffin, et al., 1982), ya que para otras isoformas de GLUT como GLUT 2 y GLUT 3 se ha descrito que el tipo de inhibición que ejerce la citocalasina B es de tipo no competitiva o mixta (Colville, et al., 1993), lo cual sugiere que GLUT 1 es la isoforma susceptible a la inhibición por citocalasina B en AS-30D.

Otro compuesto empleado en los ensayos de inhibición del transporte de glucosa fue la floretina que inhibe el transporte de glucosa en células tumorales (Berry, et al., 1994) y en células normales como eritrocito con una K_i de $3\mu\text{M}$ (LeFevre & Marshall, 1959) y una IC_{50} de $60 \mu\text{M}$ (Kasahara & Kasahara, 1996); e inhibe el transporte de glucosa en levadura con una IC_{50} de $50 \mu\text{M}$. La floretina además de inhibir el transporte de glucosa, modifica el potencial dipolo de la membrana celular afectando el transporte de sustratos como mio-inositol (mediado por GLUT13) (Berry, et al., 1994) y de diversas moléculas con diferente polaridad como glicerol, urea y cloro a concentraciones de 25 a $50 \mu\text{M}$ (Toon & Solomon, 1987; Cseh & Benz, 1999); y disminuye la sensibilidad a potasio, involucrado en la activación de canales de $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ (Owen, 1974) en fibras nerviosas de *Xenopus laevis*.

En el hepatoma AS-30D, el valor determinado para la IC_{50} ($5.6 \pm 3 \mu\text{M}$ a 15°C y $16 \pm 8 \mu\text{M}$ a 25°C) se encuentra dentro del rango de los valores descritos anteriormente. Sin embargo, la diferencia entre el valor de IC_{50} a 25°C y a 15°C , indica que a diferencia de la citocalasina B, la unión de este inhibidor al transportador de glucosa se modifica por efecto de la temperatura.

Para el ensayo de activación del transporte de glucosa se utilizó insulina, que en el caso del hepatoma AS-30D no incrementó la velocidad del transporte de glucosa al incubar a las células a concentraciones crecientes de esta hormona (tabla 14 y 15). Estos resultados sugieren que en AS-30D no se expresa la isoforma GLUT4 que es la única isoforma susceptible a estimulación por insulina, ó bien está presente pero no es funcionalmente activa. Parte del interés de realizar este ensayo de estimulación se debe a que a la fecha existen pocos estudios que han demostrado la estimulación del transporte de glucosa por insulina en células tumorales. Por mencionar alguno, en los fibroblastos transformados MEC-LAP la insulina (10 nM) aumenta 2 veces el transporte de 2-DOG al incubar a las células por 30 minutos en presencia de la hormona (Shibata, et al., 2007).

Con respecto a los ensayos de competencia por sustrato en el transporte de glucosa, existen diversos trabajos en donde se ha evaluado la actividad del transportador de glucosa utilizando diferentes carbohidratos como sustrato. Se ha descrito que la afinidad de GLUT1 por otros sustratos disminuye en el orden glucosa > manosa > galactosa (Cohen, Knecht, & Lodish, 1996). Se ha descrito también que la isoforma GLUT5 tiene mayor afinidad por fructosa que por glucosa (Gould & Holman, 1993) y se expresa en mayor proporción en el intestino delgado, riñón y músculo esquelético. En el caso de las células tumorales existen reportes para algunos tipos de líneas tumorales como el carcinoma CaCo II (Mahraoui, et al., 1992) y los carcinomas de mama MCF-7 y MDA-468 (Zamora-León, et al., 1996) en los que se ha identificado GLUT 5 por inmunohistoquímica. Sin embargo, estos estudios no se han acompañado del

ensayo de actividad para determinar la afinidad y la velocidad a la cual la fructosa es transportada.

Para realizar los ensayos de competencia por sustrato y con el interés de identificar funcionalmente la presencia de GLUT 5 en el hepatoma AS-30D, evaluamos el efecto de concentraciones crecientes de fructosa en el transporte de glucosa. Los resultados mostraron que la fructosa a concentraciones fisiológicas (menores a 50 mM) no afecta la actividad de ambos componentes en la cinética de transporte de glucosa. Aparentemente a concentraciones de 50 mM de fructosa existe una ligera disminución en la velocidad del transporte de glucosa sobre los dos componentes de la cinética. Sin embargo, se debe considerar que este efecto inhibitorio sea el resultado del aumento de la osmolaridad del medio por la alta concentración de ambos carbohidratos, ya que dichas concentraciones difícilmente se alcanzan en condiciones fisiológicas.

Una vez validado el protocolo para cuantificar el transporte de glucosa en células AS-30D, se utilizó para cuantificar el transporte en un sistema celular diferente al hepatoma y se extendió el estudio a células HeLa provenientes de cultivo bidimensional.

La determinación de la actividad de transporte de glucosa en células HeLa se realizó en condiciones de velocidad inicial distintas a las consideradas para el hepatoma AS-30D. Este cambio se debió a las diferencias en el cultivo, obtención y resistencia a la disminución de temperatura en ambos tipos de células. Las células HeLa se obtuvieron a partir de un cultivo bidimensional en condiciones de concentración de sustratos, temperatura y oxígeno controlados mientras que las células AS-30D se extrajeron y aislaron directamente del líquido de ascitis después de un periodo de desarrollo en la cavidad peritoneal de las ratas inoculadas con el hepatoma; en estas condiciones, la concentración de sustratos, temperatura y oxígeno varían en función de microambiente en

donde se desarrolla el hepatoma. Además de las diferencias en las condiciones de crecimiento y por lo tanto de metabolismo, seguramente existen diferencias en la composición y rigidez de la membrana celular entre ambos tipos de células. Lo anterior pudo ser determinante para que las células HeLa fueran mas susceptibles al daño celular al exponerlas a la disminución de temperatura de 15 y 25 °, ya que mientras en AS-30D la viabilidad determinada por el método de azul de tripán se mantuvo por arriba del 95% en cada determinación de actividad de transporte, para HeLa la viabilidad disminuyó hasta 50% después de ser incubadas a 15 °C y a tiempos de exposición a la glucosa mayores a 6 seg la actividad de GLUT no fue detectable.

Aunque la determinación del transporte de glucosa en células HeLa se realizó en condiciones distintas a las células AS-30D, podemos asegurar que las determinaciones se realizaron en condiciones de velocidad inicial porque los tiempos de exposición a la glucosa fueron cortos (6 segundos). Más aún, se ha reportado que en las células HeLa la HK no se encuentra tan activa como ocurre en AS-30D, además la G6P se encuentra en menor concentración (AS-30D 5.3 mM, HeLa 0.6 mM) y la elevada velocidad de glucólisis determinada en ausencia de estímulo externo por glucosa (velocidad de glucólisis en HeLa sin glucosa externa $7 \pm 9 \text{ nmol}(\text{min} \times \text{mg})^{-1}$) es probablemente sostenida por depósitos endógenos de glucógeno (resultados tomados de Marín-Hernández, et al., 2006). Por lo tanto, los resultados de la actividad de transporte de glucosa determinados en células HeLa son igualmente confiables que los resultados reportados para las células AS-30D.

En la cinética del transporte del GLUT en células HeLa al igual que en AS-30D a concentraciones crecientes de glucosa se determinó que el transporte está mediado por dos componentes. El primer componente de 0 a 20 mM de glucosa tuvo un comportamiento hiperbólico y el segundo componente de 20 a 40 mM de glucosa tuvo una velocidad lineal, a diferencia de AS-30D en donde el segundo componente se hace evidente a 10 mM de glucosa. Sin embargo, el

ajuste realizado a la cinética de transporte en HeLa fue el de una cinética hiperbólica debido a que la DE obtenida con los resultados preliminares no permitió ajustar al modelo de la cinética hiperbólica mas un componente lineal.

Considerando el valor de velocidad máxima para las cinéticas obtenidas en AS-30D a 15 y 25 ° C a concentraciones menores de 10 mM, se determinó un valor de Q_{10} igual a 6.8 que nos permitió estimar la V_m del transporte de glucosa a 35 °C, condición cercana a la temperatura fisiológica (37 °C). Cabe mencionar que nos enfocamos en el componente hiperbólico de la cinética de transporte para hacer esta aproximación porque es de mayor interés fisiológico, ya que las concentraciones de glucosa a las que se hace evidente van de 0 a 10 mM, concentraciones plasmáticas que pueden alcanzarse en células de mamífero.

Al comparar los valores de K_m y V_m determinados a partir de la cinética de transporte de glucosa para el hepatoma AS-30D y para las células HeLa, encontramos que son comparables con los valores descritos en la literatura para otras células tumorales (tabla 18).

Tabla 18. K_m y V_m en diferentes líneas tumorales.

	V_m [nmol(min x 10 ⁶ cels) ⁻¹]	K_m (mM)	T °C	Referencia
AS-30D	6.3	0.2	35	La presente Tesis.
HeLa	8.9	20	37	La presente Tesis.
EAT	25.5	0.8	37	(Fung, et al., 1986)
Glioma D-54MG	8	<1	25	(Griguer, Oliva, & Gillespie, 2005)
Glioma U- 251MG	68	<1	25	(Griguer, Oliva, & Gillespie, 2005).
Ishikawa ECC	2.3	0.8	25	(Medina, et al., 2004)
MDA-468	4	2	25	(Zamora-León, et al., 1996)
MCF-7	1	2	25	(Zamora-León, et al., 1996)

EAT, Erlich Ascities Tumor; ECC, Endometrial Cancer Cells.

Si comparamos los valores determinados en este trabajo con respecto a los reportes de transporte de glucosa en otras células tumorales, las diferencias en los valores de velocidad máxima van desde 1 nmol(min x 10⁶ cels)⁻¹ para las células de cáncer de mama MCF-7 hasta 68 para el Glioma U-251MG. Dichas diferencias pueden explicarse en función de diferentes factores: uno de los mas importantes es el tipo de isoformas del transportador de glucosa se expresan o sobre-expresan en ambos tipos de células, ya que MCF-7 expresa principalmente GLUT 1, 2 y 5 el Glioma U-251MG expresa GLUT 1 y 3. Otro factor que se mencionó previamente para el hepatoma AS-30D y las células HeLa son las condiciones de crecimiento y metabolismo de cada tipo de célula,

ya que las células MCF-7 proviene de un cultivo y las células de Glioma U-251MG son extraídas directamente de muestras de pacientes. Además, tal como se ha discutido en este trabajo, las condiciones del ensayo de actividad en cada tipo de célula determinan los valores obtenidos de velocidad de transporte. En conjunto, estos factores justifican en gran medida la diferencia en los valores reportados para la V_m .

En el caso de las células HeLa, la diferencia en los valores determinados para los parámetros cinéticos con respecto a los resultados obtenidos en las células AS-30D (en HeLa la K_m determinada es casi 10 veces mayor comparada con AS-30D) pueden explicarse por los resultados obtenidos por Western Blot que muestran que en HeLa se expresan GLUT 1 y GLUT 2 a diferencia de AS-30D en donde solo se expresa GLUT 1; recordando que GLUT 2 es la isoforma que tiene una menor afinidad por glucosa y probablemente este presente en mayor proporción en las células HeLa. Adicionalmente, la presencia de GLUT 1 en estas células se sustenta por los resultados preliminares de inhibición con la citocalasina B donde la IC_{50} ($0.3 \mu M$) obtenida se encuentra dentro del rango de las constantes de inhibición determinadas en AS-30D y en los reportes de inhibición para GLUT 1.

Los resultados obtenidos por Western Blot justifican los valores de las constantes cinéticas determinadas en las células HeLa y en AS-30D (tabla 18), pero además muestran las modificaciones metabólicas que presenta el hepatoma AS-30D como parte de su fenotipo tumoral, ya que no posee GLUT 2 como cabría esperarse por provenir de células hepáticas en las que en condiciones normales se expresa esta isoforma del transportador de glucosa.

Retomando los resultados del transporte de glucosa el hepatoma AS-30D y considerando la redistribución del control de flujo de la vía glucolítica (GLUT y HK controlan el 71%) se comparó la actividad de GLUT determinada en este trabajo a $35^\circ C$ [$34.4 \text{ nmol (min} \times \text{mg)}^{-1}$] con la actividad determinada para la HK

de la fracción citósolica a 37 °C [711 ± 170 nmol (min x mg)⁻¹]. De dicha comparación se observó que la actividad del transporte de glucosa es 20 veces menor que la actividad de la HK, lo cual implicaría (considerando el enfoque de comparación de V_m) que la mayor parte del control recae potencialmente en el GLUT.

Sin embargo, se ha documentado que a pesar del incremento en la cantidad de HK tumoral, en el citosol existe una concentración considerable (5 mM) de G6P, potente inhibidor de las isoformas HKI, HKII y HKIII (Wilson, 2003). En los ensayos de inhibición descritos con anterioridad por Marín-Hernández (*FEBS*, 2006) se reportó que 1 mM de G6P es suficiente para inhibir de 81 a 93% la actividad de la HK citosólica y mitocondrial. Por lo tanto, resulta lógico pensar que el exceso de este metabolito presente en el citosol inhibe la actividad de la HK a pesar del incremento en la actividad y en la cantidad de ésta enzima presente en la célula.

Por lo anterior debemos considerar la cantidad de HK y de GLUT presentes en la célula de manera activa, para identificar aquella que sea lo suficientemente baja y que por lo tanto puede ser potencialmente un sitio importante del control en la vía glucolítica. Este análisis, acompañado de la determinación cuantitativa de los coeficientes de control de flujo de la HK y el GLUT permitirá esclarecer finalmente la enzima clave en el control metabólico de la glucólisis, enzima que potencialmente podría proponerse como blanco terapéutico para el diseño racional de fármacos antineoplásicos.

8. CONCLUSIONES

- i. La técnica para determinar la velocidad de transporte de glucosa en condiciones de velocidad inicial se implementó de manera funcional en la línea tumoral AS-30D y se aplicó en la línea celular HeLa de manera exitosa.
- ii. La actividad de GLUT en la línea tumoral AS-30D es sensible a la inhibición por citocalasina B y floretina, La inhibición por citocalasina B es de tipo competitiva.
- iii. La actividad de GLUT en la línea tumoral AS-30D no es sensible a la estimulación por insulina, lo cual indica que GLUT4 no está presente de manera funcional.
- iv. La actividad de GLUT en línea tumoral AS-30D no es susceptible a la competencia por sustrato con fructosa, lo cual indica que GLUT 5 no esta presente de manera funcional.
- v. El transporte de glucosa en la línea tumoral AS-30D está mediado por dos componentes: un componente hiperbólico (de 0 a 10 mM de glucosa) y un componente lineal no saturable (de 10 a 40 mM de glucosa); ambos sensibles a temperatura. Lo mismo ocurre en células HeLa, en las que el transporte de glucosa esta mediado por dos componentes; sin embargo el componente lineal se hace evidente a mayor concentración de sustrato (de 20 a 40 mM de glucosa).
- vi. Partiendo de los valores de V_m determinados en la cinética de transporte de glucosa en el hepatoma AS-30D a 15 y a 25 °C se obtuvo una Q_{10} de 6.8; esto indica que a 35 °C la V_m del GLUT es de 34.4 ± 5.1 nmol (min x mg)⁻¹; en las células HeLa a 37 °C la V_m del GLUT es de 49.5 ± 8.7 nmol (min x mg)⁻¹. Ambos valores son comparables con lo reportado en la literatura para otras células tumorales en condiciones fisiológicas.

- vii. En AS-30D la isoforma predominante es GLUT 1, mientras que en HeLa se expresan las isoformas 1 y 2. Estos resultados junto con la caracterización cinética, indican que el primer componente de la cinética de glucosa en el hepatoma AS-30D es GLUT 1.
- viii. Finalmente a partir del análisis cinético del transporte de glucosa y considerando el enfoque de comparación de V_m de con respecto a la HK, podemos sugerir que el mayor porcentaje del control de la vía glucolítica en el hepatoma AS-30D recae potencialmente en el GLUT.

APENDICE

Apéndice 1. Participación en los artículos publicados previos a la presente Tesis.

Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells

Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase

Alvaro Marín-Hernández¹, Sara Rodríguez-Enríquez¹, Paola A. Vital-González¹, Fanny L. Flores-Rodríguez¹, Marina Macías-Silva², Marcela Sosa-Garrocho² and Rafael Moreno-Sánchez¹

¹ Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Bioquímica, Juan Badiano no. 1, Colonia Sección XVI, México, Mexico

² Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Biología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Keywords

elasticity coefficient; flux-control coefficient; hexokinase type 2; metabolic control analysis; phosphofructokinase type 1

Correspondence

R. Moreno-Sánchez, Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Bioquímica, Juan Badiano no. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México 14080, Mexico
Fax: 52 55 55730926
Tel: 52 55 55732911 ext. 1422, 1298
E-mail: rafael.moreno@cardiologia.org.mx, morenosanchez@hotmail.com

(Received 17 October 2005, revised 21 February 2006, accepted 3 March 2006)

doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05214.x

Control analysis of the glycolytic flux was carried out in two fast-growth tumor cell types of human and rodent origin (HeLa and AS-30D, respectively). Determination of the maximal velocity ($V_{\max}$) of the 10 glycolytic enzymes from hexokinase to lactate dehydrogenase revealed that hexokinase (153–306 times) and phosphofructokinase-1 (PFK-1) (22–56 times) had higher over-expression in rat AS-30D hepatoma cells than in normal freshly isolated rat hepatocytes. Moreover, the steady-state concentrations of the glycolytic metabolites, particularly those of the products of hexokinase and PFK-1, were increased compared with hepatocytes. In HeLa cells, $V_{\max}$ values and metabolite concentrations for the 10 glycolytic enzyme were also significantly increased, but to a much lesser extent (6–9 times for both hexokinase and PFK-1). Elasticity-based analysis of the glycolytic flux in AS-30D cells showed that the block of enzymes producing Fru(1,6) P_2 (i.e. glucose transporter, hexokinase, hexosephosphate isomerase, PFK-1, and the Glc6P branches) exerted most of the flux control (70–75%), whereas the consuming block (from aldolase to lactate dehydrogenase) exhibited the remaining control. The Glc6P-producing block (glucose transporter and hexokinase) also showed high flux control (70%), which indicated low flux control by PFK-1. Kinetic analysis of PFK-1 showed low sensitivity towards its allosteric inhibitors citrate and ATP, at physiological concentrations of the activator Fru(2,6) P_2 . On the other hand, hexokinase activity was strongly inhibited by high, but physiological, concentrations of Glc6P. Therefore, the enhanced glycolytic flux in fast-growth tumor cells was still controlled by an over-produced, but Glc6P-inhibited hexokinase.

It is well documented that fast-growth tumor cells have higher rates of lactate formation even under aerobic conditions than nontumorigenic cells. For instance, different types of hepatoma (Reuber, Morris, Dunings LC18) and fibrosarcoma 1929 exhibit rates of 0.2–2.7 $\mu\text{mol lactate}\cdot\text{h}^{-1}\cdot(\text{mg protein})^{-1}$, whereas normal

liver and kidney cells have rates of 0.05 $\mu\text{mol lactate}\cdot\text{h}^{-1}\cdot(\text{mg protein})^{-1}$ [1,2].

The increase in tumor glycolysis has been associated with the activation of several oncogenes (*c-myc*, *ras* and *src*) or with the expression of the hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) in transformed human lymphoblastoid

Abbreviations

DHAP, dihydroxyacetone phosphate; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GluT, glucose transporter; LDH, lactate dehydrogenase; PFK-1, phosphofructokinase type 1.

and human U87 glioma [3,4]. As a result of oncogene activation and expression, the over-expression of several genes encoding eight glycolytic proteins, including the glucose transporter (GluT), takes place [5]. The over-expression of a plasma membrane H^+ -ATPase in rat fibroblasts, to alter the cytosolic pH regulation, and presumably enhance ATP consumption, also promotes a sevenfold stimulation of glycolysis, in addition to inducing malignant transformation [6].

In comparison with hepatocytes, in several fast-growth tumor cells (AS-30D, Novikoff) there is over-expression of hexokinase-II [7,8], due to the activation of its own promoter, through a demethylation process [9] or through protein p53 activation (an abundant protein in fast-growth tumor cells) [10].

Binding of tumoral hexokinase-II to the mitochondrial outer membrane apparently changes its kinetic properties, compared with the cytosolic isoenzyme, i.e. mitochondrial hexokinase-II shows lower sensitivity ($\approx 30\%$) to inhibition by its product Glc6P [7]. The close vicinity of hexokinase-II to the adenine nucleotide translocase in tumor mitochondria ensures that mitochondrial ATP is preferentially used for hexose phosphorylation [8]. It has also been reported that hexokinase-II plays an important role in preventing apoptotic events, such as cytochrome *c* release in HeLa cells, by interfering with the binding of the pro-apoptotic protein Bax to the outer mitochondrial membrane [11].

In normal tissues, citrate and ATP are potent allosteric inhibitors of phosphofructokinase type 1 (PFK-1) [12], where it is mainly constituted by M subunits, but this does not occur when the predominant subunit is L or C [13]. The tumoral isoenzyme is less sensitive to the inhibitory effect of these two allosteric effectors [13,14]. In this regard, it has been observed that the subunit L or C content of tumor PFK-1 increases, whereas that of subunit M decreases, which explains the smaller effect of its negative modulators [15–17]. It has also been reported that the content of Fru(2,6) P_2 (a potent PFK-1 activator [12]) in HeLa cells, Ehrlich ascites cells and HT29 human colon adenocarcinoma is much higher than in normal hepatocytes [20–80 versus 6 pmol(mg protein) $^{-1}$, respectively] [18–21]. These observations suggest that PFK-1 is highly active in tumors cells [13,20].

In mammalian nontumorigenic systems, such as human erythrocytes and rat perfused heart, glycolytic flux is mainly controlled by hexokinase (60–80%) and PFK-1 (20–30%) [22,23]. In tumor cells, an expected consequence of the over-expression of several glycolytic enzymes and glucose transporters, and kinetic changes in hexokinase and PFK-1, is a large modification

of the regulatory mechanisms and functioning of the pathway. Hence, the assumption that control of the glycolytic flux in tumor cells is similar to that of normal cells is apparently not well supported. Therefore, to identify the flux-controlling sites of tumoral glycolysis, we firstly determined the $V_{\max}$ of each glycolytic enzyme from hexokinase to lactate dehydrogenase (LDH) in AS-30D and HeLa cells. Measurement of enzyme activity under $V_{\max}$ conditions ensures the determination of the content of active enzyme and allows the degree of over-expression compared with normal cells to be established. Secondly, we determined the steady-state concentrations of several intermediate metabolites to identify enzymes that may impose limitations on the glycolytic flux, although such inferences do not always hold, particularly for intermediates involved in more than two reactions.

To evaluate quantitatively flux control in tumoral glycolysis, we used the theory of the metabolic control analysis [24] by applying an elasticity analysis. This consists of the experimental determination of the sensitivity of segments of the pathway towards a common intermediate. Once we had identified the main sites of flux control, we performed experiments to determine which biochemical mechanisms are involved in establishing why some enzymes exert significant control and others do not.

Results

Maximal activities of glycolytic enzymes in hepatocytes and fast-growth tumor cells

In normal freshly isolated hepatocytes, the enzymes with lower activity (and hence less content) were hexokinase < PFK-1 < aldolase, enolase (Table 1). This activity pattern is in agreement with that found in hepatocytes by other authors [7,15]. In whole liver, the activities of all glycolytic enzymes were very similar, except for pyruvate kinase, which was 3 times lower than that obtained in isolated hepatocytes (data not shown). In an attempt to establish a proliferating, non-tumorigenic cell system, to make a more rigorous comparison with the tumor cell lines used in this work, we also isolated hepatocytes from regenerating rat liver; organ regeneration was induced by prior treatment with CCl_4 [0.39 g(kg body weight) $^{-1}$] for 12 or 24 h. In two different cell preparations, the $V_{\max}$ values of the glycolytic enzymes were essentially identical with those found for normal isolated hepatocytes (data not shown).

In rat AS-30D hepatoma cells, the enzymes with lower activity were hexokinase, PFK-1 and aldolase, a

Table 1. Maximal activity of glycolytic enzymes in hepatocytes and tumor cells. AS-30D, HeLa and hepatocytes (65 mg protein·mL⁻¹) were incubated in lysis buffer as described in Experimental procedures. Activities of all enzymes were determined in the cytosolic-enriched fraction at 37 °C. Specific activities are expressed in U·(mg protein)⁻¹. The values shown represent the mean $\pm$ SD with the number of different preparations assayed in parentheses. HK, hexokinase; HPI, hexosephosphate isomerase; TPI, triosephosphate isomerase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PGK, phosphoglycerate kinase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PYK, pyruvate kinase; LDH, lactate dehydrogenase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; α -GPDH, α -glycerophosphate dehydrogenase; PGM, phosphoglucomutase; ND, not detected.

Enzymes	Hepatocytes	AS-30D	AS-30D/ hepatocytes	HeLa
HK	0.003 $\pm$ 0.002 (3)	0.46 $\pm$ 0.1** (7)	153	0.02 $\pm$ 0.006†† (4)
HPI ^a	0.4 $\pm$ 0.05 (3)	1.6 $\pm$ 0.7* (4)	4	3.0 $\pm$ 1.7 (4)
PFK-1 ^b	0.01 $\pm$ 0.002 (3)	0.21 $\pm$ 0.1* (4)	22	0.09 $\pm$ 0.02 †(5)
Aldolase	0.09 $\pm$ 0.02 (3)	0.23 $\pm$ 0.07* (4)	2.7	0.2 $\pm$ 0.05 (5)
TPI ^a	15.6 $\pm$ 5.6 (3)	56 $\pm$ 15* (4)	3.6	42 $\pm$ 13 (3)
GAPDH	0.32 $\pm$ 0.07 (3)	1 $\pm$ 0.28* (3)	2.7	2 $\pm$ 0.74 (5)
GAPDH ^a	0.66 $\pm$ 0.23 (3)	0.9 (2)	1.4	2.5 $\pm$ 0.8 (5)
PGK	8.2 $\pm$ 5.8 (3)	27 $\pm$ 10* (4)	3.3	13 $\pm$ 6† (5)
PGAM	11 $\pm$ 2 (3)	20 $\pm$ 5* (4)	2.3	1.4 $\pm$ 1 (4)
Enolase	0.11 $\pm$ 0.03 (3)	0.51 $\pm$ 0.13* (3)	4.3	0.36 $\pm$ 0.15 (5)
PYK	0.8 $\pm$ 0.36 (3)	6.6 $\pm$ 1.5** (4)	8.1	3 $\pm$ 1.3 † (4)
LDH	4.4 $\pm$ 1.9 (3)	6.4 $\pm$ 3.7 (4)	1.5	1.7 $\pm$ 0.6 (3)
G6PDH	0.03 $\pm$ 0.003 (3)	0.05 $\pm$ 0.02 (3)	1.4	0.22 $\pm$ 0.08†† (5)
PGM ^c	0.37 (2)	0.21 $\pm$ 0.06 (5)	0.6	0.42 $\pm$ 0.13 (4)
α -GPDH ^d	0.11 (2)	0.002 $\pm$ 0.001 (3)	0.05	ND

* P < 0.05 versus hepatocytes, ** P < 0.005 versus hepatocytes, † P < 0.05 versus AS-30D, †† P < 0.005 versus AS-30D. Student's t -test for nonpaired samples. ^a Activity in the reverse reaction. ^b Activity determined in the presence of 16–20 mM NH₄⁺. ^c The PGM activity was determined in the absence of glucose-1,6- bisphosphate. ^d The reaction was started by adding DHAP.

pattern that also agrees with that reported for the same cells [7] and for other tumor cell types [25]. The AS-30D/hepatocyte activity ratio revealed that hexokinase and, to a lesser extent, PFK-1 were the enzymes that were most over-expressed in tumor cells; all other glycolytic enzymes, including glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), were also over-expressed in AS-30D tumor cells (Table 1).

In HeLa cells, all glycolytic enzymes, except phosphoglycerate mutase, also exhibited a higher activity than that shown by hepatocytes. However, in these human tumor cells neither hexokinase nor PFK-1 were highly over-expressed as they were in rodent AS-30D cells. In HeLa cells, hexosephosphate isomerase, PFK-1, triosephosphate isomerase and pyruvate kinase, together with G6PDH, showed greater over-expression compared with hepatocytes (Table 1). $V_{\max}$ for phosphoglycerate mutase in HeLa cells was 14 and 8 times lower than that found in AS-30D cells and hepatocytes, respectively; such low phosphoglycerate mutase activity has also been observed by other authors [25]. Negligible α -glycerophosphate dehydrogenase activity was found in both tumor cell types. A similar observation has been described for the Morris hepatomas 3924A, 5123D, 7793 and 44 [26], which are fast or moderate-growth tumor lines [27].

Glycolytic flux and intermediary concentrations

As expected from the general increase in glycolytic enzymes, steady-state generation of lactate in the presence of 5 mM glucose was markedly higher in AS-30D and HeLa cells (9–13 times) than in hepatocytes (Table 2). In the absence of added glucose, the glycolytic flux diminished drastically in both tumor cell types, being negligible in AS-30D cells. The difference between the rates of lactate formation with and with-

Table 2. Glycolysis in hepatocytes and tumor cells. AS-30D and HeLa cells (15 mg protein·mL⁻¹) and hepatocytes (30 mg protein·mL⁻¹) were incubated in Krebs–Ringer medium as described in Experimental procedures. Under these conditions, the rate of lactate formation in AS-30D cells was constant after 2 min and up to 10 min from glucose addition (i.e. steady-state glycolysis). The intracellular concentration of Fru(1,6)P₂ was also invariant between the 2- and 10-min points, after the addition of glucose (data not shown). Glycolytic fluxes are expressed in nmol·min⁻¹·(mg cell protein)⁻¹. The values shown represent the mean $\pm$ SD with the number of different preparations assayed in parentheses. The negative flux value indicates lactate consumption.

Condition	Hepatocytes	AS-30D	HeLa
+ Glucose	2.4 $\pm$ 1.7 (6)	21 $\pm$ 9 (40)	32 $\pm$ 10 (8)
– Glucose	– 0.4 $\pm$ 1 (6)	– 2.2 $\pm$ 2.6 (17)*	7 $\pm$ 9 (6)

out added glucose indicates that net glycolytic flux depends on external glucose, which was 8–9 times higher in AS-30D and HeLa cells than in hepatocytes.

The elevated glycolytic flux in HeLa cells in the absence of added glucose was probably sustained by endogenous sources, i.e. glycogen degradation. The content of glycogen was apparently not depleted in HeLa cells by the 10 min preincubation at 37 °C. In contrast, the total dependence of the glycolytic flux on external glucose in AS-30D cells suggests depletion of glycogen induced by the 10 min preincubation at 37 °C. The glycolytic flux values reported in this work are in the same range as reported for other tumor cell types [2].

The steady-state concentrations of all glycolytic metabolites in AS-30D tumor cells also significantly increased, except for phosphoenolpyruvate and pyruvate (Table 3). In particular, Fru(1,6) P_2 increased 250 times and dihydroxyacetone phosphate (DHAP) 16.6 times. The cytosolic pyridine nucleotide redox state (NADH/NAD⁺), estimated from the lactate/pyruvate ratio, was more reduced in AS-30D cells, a situation that favors flux through biosynthetic pathways. The concentration of ATP was also higher in AS-30D cells than in hepatocytes; however, the ATP/ADP ratio was similar (2.3 and 2.4). The latter values are similar to those previously reported [28] for normal organs such as rat heart (5.7) and liver (4.9), as well as mouse Ehrlich ascites cells (2.3) and 3924A hepatoma cells (1.2).

Table 3. Steady-state concentrations (mM) of glycolytic intermediates in normal rat hepatocytes and hepatoma cells. See legend to Table 2 and Experimental procedures for experimental details. Values shown are the mean $\pm$ SD. The number of experiments is shown in parentheses. ND, not detected; NM, not measured; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; Lac, lactate; Pyr, pyruvate.

Metabolite	Hepatocytes	AS-30D	HeLa
Glucose	NM	6.2 $\pm$ 1 (3)	NM
Glc6P	0.96 $\pm$ 0.16 (3)	5.3 $\pm$ 2.6** (23)	0.6 $\pm$ 0.16†† (4)
Fru6P	0.4 $\pm$ 0.03 (3)	1.5 $\pm$ 0.7** (22)	0.22 $\pm$ 0.09†† (4)
Fru(1,6) P_2	0.1 $\pm$ 0.05 (3)	25 $\pm$ 7.6** (19)	0.29 $\pm$ 0.06†† (4)
DHAP	0.6 $\pm$ 0.1 (3)	10 $\pm$ 2.3** (14)	0.93 $\pm$ 0.07†† (3)
G3P	0.09 $\pm$ 0.01 (3)	0.9 $\pm$ 0.4* (7)	ND
PEP	0.1 (2)	0.1 $\pm$ 0.02 (3)	0.32 (2)
Pyr	1.6 $\pm$ 0.7 (3)	2.1 $\pm$ 1 (7)	8.5 $\pm$ 3.6†† (5)
Lac ^a	9.6 $\pm$ 1.3 (3)	27 $\pm$ 11* (3)	33 (2)
ATP	3.6 $\pm$ 0.24 (3)	5.6 $\pm$ 1.2* (9)	9.2 $\pm$ 1.9† (4)
ADP	1.6 $\pm$ 0.6 (4)	2.4 $\pm$ 0.7 (7)	2.7 $\pm$ 1.3 (3)
Lac/Pyr ratio	6.3	12.9	3.9

^a L-Lactate was intracellularly located. * P < 0.05 versus Hepatocytes, ** P < 0.005 versus Hepatocytes, † P < 0.05 versus AS-30D, †† P < 0.005 versus AS-30D.

In contrast with AS-30D cells, the steady-state concentrations of Glc6P, Fru6P, Fru(1,6) P_2 and DHAP in HeLa cells were similar to those observed in hepatocytes, whereas the ATP and pyruvate concentrations were 1.6 and 4 times higher than in AS-30D cells (Table 3).

Determination of flux control coefficients for glycolysis in hepatoma cells

Metabolic control analysis establishes how to determine quantitatively the degree of control (named flux control coefficient, C_{Ei}^J) that each enzyme E_i exerts over the metabolic flux J [24]. In the oxidative phosphorylation pathway, C_{Ei}^J values can be determined by titrating the flux with specific inhibitors [24,29,30]. However, there are no specific, permeable inhibitors for each glycolytic enzyme.

An alternative approach called elasticity analysis [31–34] consists of experimental determination of the sensitivity of enzyme blocks towards a common intermediate metabolite m . By applying the summation and connectivity theorems of metabolic control analysis (see Eqns 1 and 2 in Experimental procedures), the C_{Ei}^J values can be calculated. Variations in the steady-state activity of the enzyme blocks can be attained by adding different concentrations of the initial substrate or inhibitors of either block, which do not have to be specific for only one enzyme but they do have to inhibit only one block. The block of enzymes that generates the common intermediate is named the producer block, whereas the block of enzymes consuming that metabolite is named the consumer block.

For glycolysis, and other pathways, any metabolite may be used as the common intermediate that connects producer and consumer branches. However, to reach consistent results, it is more convenient to use, as common intermediates, metabolites that are present at relatively high concentrations and that are only connected to the specific pathway, such as Fru(1,6) P_2 . Although other metabolites such as Glc6P, Fru6P and DHAP may be present at high concentrations, they are connected with other pathways (glycogen synthesis and degradation, pentose phosphate cycle, glycerol and triacylglycerol synthesis). However, this last group of metabolites may still be used in elasticity-based analysis as long as the flux through the other pathways is low (or it is assumed to be negligible) [33,35,36] or by actually determining the effect of the branching pathways on the main flux and on the concentration of the connecting metabolite [23].

To determine the elasticity coefficients of the consumer block for the common metabolite (ϵ_m^{Ei}), we

incubated hepatoma cells with different glucose concentrations (4–6 mM) or with the hexosephosphate isomerase inhibitor 2-deoxyglucose (0.5–10 mM), which induced variations in flux and in the steady-state concentrations of the metabolite. The elasticity of the producer block was determined by titrating flux with the LDH inhibitor, oxalate (0.5–2 mM), or the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitor, arsenite (5–100 μ M). Thus, the glycolytic flux (measured as the rate of lactate formation) and the concentration of several intermediates [Glc6P, Fru6P, Fru(1,6) P_2 and DHAP] were determined under both conditions. The tangents to the curves, or the straight lines, taken at the reference, control points (100%) in the normalized plots of flux versus [metabolite] obtained with glucose and oxalate, or 2-deoxyglucose and arsenite, represent the elasticities towards the intermediate metabolite of the consumer and producer blocks, respectively.

We are aware that the experimental points in the flux versus [metabolite] plot should be fitted to a hyperbolic curve rather than to a straight line, as most of the glycolytic enzymes and transporters follow a Michaelis–Menten kinetic pattern; a near-linear relation between rate and substrate concentration might be attained when the product concentration varies concomitantly. However, the lack of sufficient experimental points near the reference, unaltered state may generate high, unrealistic slope values ($\gg 2$) for the estimation of elasticity coefficients (Fig. 1) either by fitting to hyperbolic or linear equations. The definitions of the elasticity and flux control coefficients as well as the theorems of metabolic control analysis are based on differentials. However, it was not easy to produce small changes (and much less infinitesimal changes) of flux and metabolite concentration by using the experimental protocols described. In consequence, slope values were calculated with both approximations, non-linear hyperbolic fitting and linear regression. In general, similar elasticity coefficients resulted from either approximation, although less dispersion was attained with the linear regression (see legend to Table 4 for values).

Titration of the glycolytic flux with exogenous glucose and oxalate (Fig. 1A), or with 2-deoxyglucose and arsenite (Fig. 1B), induced changes in flux and the Fru(1,6) P_2 concentration. Analysis of both segments showed that the Fru(1,6) P_2 consumer block (formed by enzymes from aldolase to LDH) showed a higher elasticity than the producer block (comprising GluT to PFK-1). In the first case (with glucose or 2-deoxyglucose), the slope had a positive value because Fru(1,6) P_2 is a substrate for the consumer block. On the other hand, with oxalate or arsenite titration, the

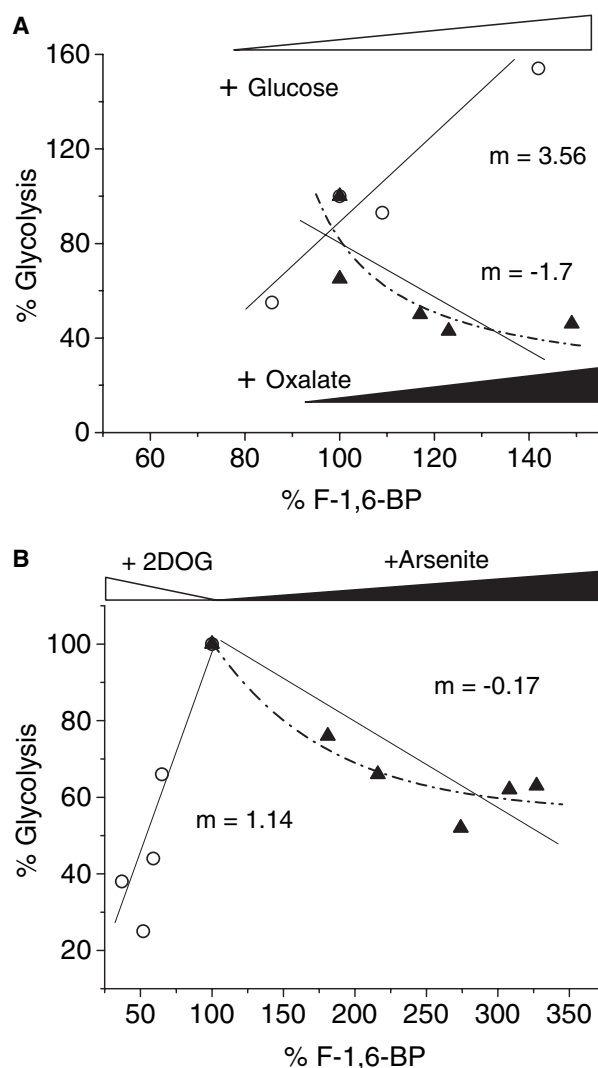


Fig. 1. Experimental determination of elasticity coefficients for glycolytic intermediates in tumor cells. AS-30D hepatoma cells (15 mg protein·mL⁻¹) were incubated in Krebs–Ringer medium at 37 °C. After 10 min, different concentrations of glucose (○, 4–6 mM) and oxalate (▲, 0.5–2 mM) in (A), or 2-deoxyglucose (○, 0.5–10 mM) and arsenite (▲, 5–100 μ M) in (B), were added to the cell suspension. When a glycolytic inhibitor was added, glucose was kept constant at 5 mM. The hexokinase and PFK-1 activities, which are part of the Fru(1,6) P_2 -producing block, were not affected by 10 mM oxalate or 1 mM arsenite (data not shown). Thus, the effect of these two inhibitors on flux was due to their interaction with enzymes of the Fru(1,6) P_2 -consuming block, most likely LDH [66] (data not shown) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [67]. The values of the straight lines, or the tangents to the curves, at 100% Fru(1,6) P_2 (m), which are the elasticity coefficients in these normalized plots, are shown on the traces.

slope had a negative value because Fru(1,6) P_2 is a product of the producer block, i.e. Fru(1,6) P_2 accumulation inhibits the producer activity.

Table 4. Control (C) and elasticity (ε) coefficients values of AS-30D hepatoma cells. Control coefficients were calculated from elasticity coefficients, derived from data such as those shown in Fig. 1, and applying summation and connectivity theorems (Eqns 1 and 2; see Experimental procedures). ε_m^p , elasticity of producer block; ε_m^c , elasticity of consumer block; C_P^J , control coefficient of producer block; C_C^J , control coefficient of consumer block. All the elasticity coefficients shown in the table were calculated by using slope values derived from linear regression, although similar values were attained by nonlinear regression. For instance, the nonlinear regression for the titrations with 2-deoxyglucose and arsenite gave ε_{FBP}^c and ε_{FBP}^p of 1.99 ± 0.79 and -1.5 ± 1.6 , which yielded the C_C^J and C_P^J of 0.39 ± 0.24 and 0.61 ± 0.24 , respectively. The number of experiments is shown in parentheses, and values are mean $\pm$ SD. DHAP, Dihydroxyacetone phosphate.

Metabolite	ε_m^c	C_C^J	ε_m^p	C_P^J
	+ Glucose		+ Oxalate	
Glc6P	2.1 ± 1.7 (6)	0.29 ± 0.17 (3)	-0.86 ± 0.41 (3)	0.71 ± 0.17 (3)
Fru6P	1.2 ± 0.45 (4)	0.31 ± 0.14 (3)	-0.67 ± 0.43 (3)	0.69 ± 0.14 (3)
Fru(1,6) P_2	2.2 ± 0.95 (5)	0.44 ± 0.08 (5)	-1.35 ± 0.66 (6)	0.62 ± 0.08 (5)
DHAP	1.27 ± 0.47 (5)	0.49 ± 0.18 (5)	-1.5 ± 1 (5)	0.51 ± 0.18 (5)
	+ 2-Deoxyglucose		+ Arsenite	
Fru(1,6) P_2	0.93 ± 0.2 (3)	0.24 ± 0.06 (3)	-0.25 ± 0.1 (3)	0.75 ± 0.05 (3)
	+ Glucose		+ Arsenite	
DHAP	1.18 ± 0.2 (3)	0.37 ± 0.15 (3)	-0.5 ± 0.1 (3)	0.63 ± 0.14 (3)

It is worth emphasizing that, owing to the multitude of variables involved in determining flux and intermediary concentrations, which have to be kept constant during the experimental determination of elasticities towards one metabolite, the dispersion of the experimental points can be considerable in some cell preparations. This can be appreciated in Fig. 1 and in the values shown in Table 4. Nonetheless, it is possible to reach relevant conclusions about which steps exert significant flux control of glycolysis and which steps have low or negligible control (Table 5).

The elasticity coefficients, estimated from experiments such as those shown in Fig. 1, are summarized in Table 4. The flux control coefficients derived from the elasticity coefficients are also shown. These data clearly established that the main control of the glycolytic flux in AS-30D cells resides in the upstream part of the pathway. The experiments with glucose and oxalate show a high value for the flux control coefficient of the Glc6P producer block [$C_{P(\text{Glc6P})}^J$], which indicates that GluT, hexokinase and perhaps the degrada-

tion of glycogen, steps that lead to the formation of Glc6P, were the sites that exerted most of the flux control. In turn, the experiments with 2-deoxyglucose and arsenite revealed that the producer block of Fru(1,6) P_2 exerted most of the control, which indicates that flux control was mainly located in GluT, hexokinase and glucogenolysis together with hexosephosphate isomerase and PFK-1.

The same conclusion may be drawn from the high $C_{P(\text{Fru6P})}^J$ value (Table 4). However, the glycolytic flux was negligible in the absence of added glucose (Table 2), indicating that Glc6P and Fru6P formation from glycogen degradation was not significant in AS-30D cells. Hence, from the difference between the values of $C_{P(\text{Glc6P})}^J$ and $C_{P(\text{Fru6P})}^J$, which were determined under the same experimental conditions with glucose and oxalate, it was possible to calculate a specific flux control value of -0.02 for the Glc6P branches, pentose phosphate cycle and glycogen synthesis (Table 4).

Because of the less than perfect match of C_C^J and C_P^J values estimated from three different experimental protocols (Table 4), it was difficult to obtain a reliable flux control coefficient for the DHAP consumer branch. With 2-deoxyglucose and arsenite, the $C_{P(\text{Fru}(1,6)P_2)}^J$ value of 0.75 suggests that the rest of the pathway (from aldolase to LDH) exerts a flux control of 0.25 (Table 5). However, the $C_{C(\text{DHAP})}^J$ values with glucose and oxalate or with glucose and arsenite were 0.49 and 0.37, respectively, which revealed some discrepancy with the 2-deoxyglucose and arsenite protocol. If the total summation of C_{Ei}^J values was higher than 1.0, then branching in the middle and lower segments of glycolysis might be significant, bringing about negative flux control coefficients.

Table 5. Distribution of control of glycolysis in AS-30D cells. GluT, Glucose transporter; HK, hexokinase; HPI, hexosephosphate isomerase; TPI, triosephosphate isomerase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PGAM, phosphoglycerate mutase; PYK, pyruvate kinase; LDH, lactate dehydrogenase.

Enzymes or branches	C_{Ei}^J
GluT + HK	0.71
Pentose phosphate cycle + HPI + glycogen synthesis	-0.02
PFK-1	0.06
Aldolase, TPI, GAPDH, PGAM, enolase, PYK, LDH, Pyr branches, ATP demand	0.25
$\Sigma C_{Ei}^{J(\text{glycolysis})} =$	1.00

The flux control coefficient of PFK-1 (Table 5) was estimated from the $C_{P(\text{Fru}(1,6)P_2)}^J$ value attained with 2-deoxyglucose and arsenite minus the $C_{P(\text{Glc}6P)}^J$ value attained with external glucose and oxalate (Table 4). Only positive differences between C_P^J values are to be taken into account for elucidating flux control for specific enzymes. With negative differences [for instance, with $C_{P(\text{Fru}(1,6)P_2)}^J$ minus $C_{P(\text{Fru}6P)}^J$ both attained with glucose and oxalate], the explanation is that there is a pathway branch at the measured metabolite concentration, or that the experimental dispersion masks small differences, or that indeed there is no difference between the enzyme blocks analyzed.

Kinetic analysis of tumoral hexokinase and PFK-1

To understand why hexokinase retained a significant degree of control on glycolytic flux, despite its high over-expression, and why PFK-1 control became negligible, the kinetic properties of the two enzymes were analyzed in cell extracts. The affinity of hexokinase for glucose and ATP in both the cytosolic and mitochondrial fractions (Table 6) was in the same range as reported by Wilson [37] for hexokinase from nontumorigenic mammalian tissues. Hexokinase was equally

distributed between the cytosol and mitochondria in AS-30D hepatoma cells. Both hexokinase isoenzymes, cytosolic and mitochondrial, were 81–93% inhibited by 1 mM Glc6P (Fig. 2A).

The PFK-1 in the cytosolic-enriched fraction from AS-30D cells exhibited K_m and $K_{0.5}$ values for ATP and Fru6P (Table 6) similar to those reported for PFK-1 from other tumor cell lines [13,15]. In the absence of added effectors, the PFK-1 kinetic pattern was sigmoidal with respect to Fru6P [although $\approx 8\text{--}12$ mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ coming from the coupling enzymes was present], and hyperbolic with respect to low concentrations of ATP (0.01–1 mM). At high concentrations (> 1 mM), ATP was inhibitory for PFK-1 activity. Citrate was also inhibitory at relatively low (< 1 mM) Fru6P concentrations. However, when 1.5 mM Fru6P (physiological concentration) or higher concentrations were used, citrate was innocuous, even at concentrations as high as 10 mM (data not shown), in the presence of 8–10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Fru(2,6) P_2 was the most potent activator of tumoral PFK-1, followed by AMP and NH_4^+ (Table 6).

The mean $\pm$ SD intracellular concentrations of AMP and citrate determined under glycolytic steady-state conditions in AS-30D cells were 3.3 ± 1.4

Table 6. Tumoral hexokinase and PFK-1 kinetic parameters. The activities of hexokinase and PFK-1 were determined at 37 °C as described in Experimental procedures. For hexokinase, the K_m value for ATP was determined in the presence of 5 mM glucose, whereas that for glucose was determined with 10 mM ATP. For PFK-1, the K_m value for ATP was determined in the presence of 10 mM Fru6P, whereas the $K_{0.5}$ value for Fru6P was determined with 0.25 mM ATP. The ammonium concentration in the assay mixture, proceeding from the coupling enzymes, was 16–20 mM. The $K_{0.5}$ values for NH_4^+ , AMP and Fru(2,6) P_2 were determined in the presence of 2 mM Fru6P and 0.8 mM ATP, and with lyophilized coupling enzymes (i.e. in the absence of contaminating ammonium). The number of independent experiments is shown in parentheses. Units of K_m and $K_{0.5}$ are μM ; $V_{\max}$, $\text{U} \cdot (\text{mg protein})^{-1}$.

Hexokinase	ATP		Glucose	
	K_m	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$
Mitochondrial	696 ± 180 (3)	1.96 ± 0.4 (3)	146 ± 12 (3)	1.65 ± 0.18 (3)
Cytosolic	990 ± 50 (3)	0.52 ± 0.1 (3)	180 ± 40 (3)	0.44 ± 0.1 (3)
Type I ^a	500		30	
Type II ^a	700		300	
Type III ^a	1000		3	
PFK-1	ATP		Fru6P	
	K_m	$V_{\max}$	$K_{0.5}$	$V_{\max}$
	14 ± 2 (3)	0.2 ± 0.09 (3)	200 (2)	0.2 (2)
	NH_4^+		AMP	
	$K_{0.5}$	$V_{\max}$	$K_{0.5}$	$V_{\max}$
	1400 ± 800 (3)	0.51 ± 0.2 (3)	100 ± 50 (4)	0.58 ± 0.14 (4)
	Fru(2,6) P_2			
	$K_{0.5}$	$V_{\max}$		
	0.96 ± 0.3 (3)	0.52 ± 0.16 (3)		

^a Values taken from [37].

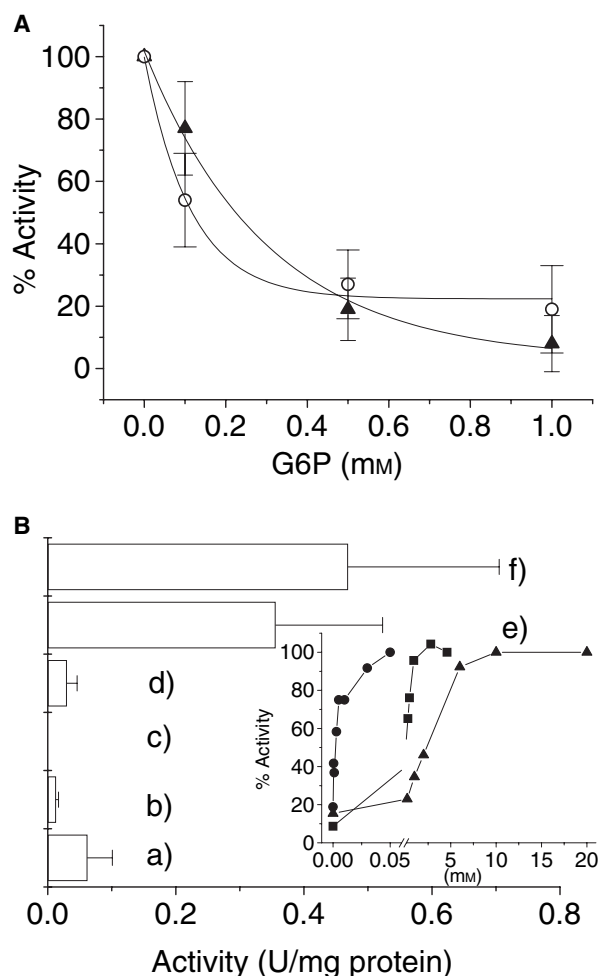


Fig. 2. Effect of modulators on tumoral hexokinase and PFK-1. (A) Inhibition of mitochondrial bound (○) and cytosolic hexokinase (▲) by Glc6P. Values shown represent the mean $\pm$ SD from three different preparations assayed, except for the experiments with cytosolic hexokinase at 0 and 1 mM Glc6P, in which nine different preparations were analyzed. (B) Effect of modulators of PFK-1. PFK-1 activity was determined in the presence of 1.5 mM Fru6P and (a) 0.8 mM ATP; (b) 3.9 mM ATP; (c) 3.9 mM ATP + 1.7 mM citrate; (d) 3.9 mM ATP + 1.7 mM citrate + 3.2 mM AMP; (e) 3.9 mM ATP + 1.7 mM citrate + 3.2 mM AMP + 5 μ M Fru(2,6)P₂; and (f) 3.9 mM ATP + 1.7 mM citrate + 3.2 mM AMP + 50 μ M Fru(2,6)P₂. Values shown represent the mean $\pm$ SD from three different preparations assayed. Inset: Activation of PFK-1 by different concentrations of Fru(2,6)P₂ (●), AMP (■) and NH₄⁺ (▲), in the presence of 2 mM Fru6P and 0.8 mM ATP.

($n = 10$) and 1.7 ± 0.7 mM ($n = 6$), respectively. Thereafter, the PFK-1 activity was determined in the presence of the intracellular concentrations of its substrates (ATP, Fru6P), inhibitors (ATP, citrate) and activators [AMP, Fru(2,6)P₂]. PFK-1 activity was fully inhibited in the presence of ATP and citrate; this activity was only partially restored by AMP (Fig. 2B). The

potent ATP + citrate inhibition was totally overcome, or even surpassed, by Fru(2,6)P₂ at concentrations found in tumor cells [18–21].

Discussion

Distribution of glycolytic flux control

Metabolic control analysis has been applied to determine the control structure of glycolysis in several normal mammalian systems, such as human erythrocytes, rat heart and mouse skeletal muscle extracts [22,23,38]. With this quantitative framework, hexokinase and PFK-1 have been identified as the main controlling steps. Fast-growth tumor cells develop a nontypical metabolism [39,40], which includes an accelerated glycolytic flux. As glycolysis in different tumor lines has been considered to be an extremely fast pathway [39], the identification of which enzyme(s) controls glycolytic flux becomes clinically relevant.

The 10 enzymes of the AS-30D hepatoma glycolytic pathway showed higher activity than in normal rat hepatocytes. Despite showing the greatest over-expression, hexokinase and PFK-1, together with aldolase, had the lowest $V_{\max}$ values (Table 1). Other groups have described a similar pattern for AS-30D [7] and other tumor cell types [25]. However, in all previous papers [7,15,25,41,42] it was difficult to establish a strict activity sequence order, as not all glycolytic activities were determined; moreover, the activity assays were performed at nonphysiological pH (>7) and temperature (<37 °C). Indeed, determining $V_{\max}$ under near-physiological conditions establishes the true content of active enzyme, which is not possible when mRNA, or protein, is measured.

The tumoral hexokinase and PFK-1, enzymes that in normal tissues control the flux (100% in human erythrocytes, 59% in isolated rat heart, and 100% in rat skeletal muscle reconstituted pathway) [22,23,38], exhibited the highest activity enhancement (306-fold and 22–56-fold increase versus hepatocytes; Table 1). In addition, the cytosolic concentrations of Glc6P and Fru(1,6)P₂, which are products of hexokinase and PFK-1, respectively, increased by fivefold and 250-fold (Table 3). The upper limits of activity increment were established by taking into account both the cytosolic and mitochondrial hexokinase activities (Table 6), and the PFK-1 maximal activity attained in the presence of the activator Fru(2,6)P₂ (Fig. 2B inset).

The flux control coefficients calculated from elasticities are, to a great extent, determined by the definition of producing and consuming blocks [24,43,44]. Elasticity-based analysis requires that (a) the metabolic

pathway reaches a quasi-steady-state (see legend to Table 2 for experimental details on how the glycolytic steady-state flux was established), and (b) the intermediates that link the blocks are not significantly affected by other pathways. However, some of the glycolytic intermediates used in this work for the estimation of elasticity coefficients such as Glc6P, Fru6P and DHAP are indeed connected to other pathways, and hence changes in the flux of glycogen synthesis and degradation, pentose phosphate cycle, and glycerol and triacylglycerol synthesis might affect the concentrations of these metabolites.

Another important assumption (c) in this elasticity-based analysis is that producing and consuming blocks affect each other only through the common metabolite. However, the glycolytic segments analyzed in this work may also interact through the moiety-conserved pools of ATP–ADP–AMP and NAD(P)H–NAD(P)⁺. The discrepancy in the calculated flux control coefficients for producing and consuming blocks of DHAP and Fru(1,6)P₂, by using different experimental protocols (Table 4), might partly be due to variation in the nicotinamide nucleotide redox state and adenine nucleotide energy state, respectively.

Furthermore, the elasticity-based analysis might be flawed, and the control distribution reported might be erroneous, if the concentrations of adenine nucleotides also varied in the titration experiments. It is worth mentioning that several other studies involving elasticity-based analysis have not taken into account the potential interactions between producing and consuming blocks mediated by the pool of adenine nucleotides [23,33–36,45]. Therefore, the variation in the concentrations of ATP, ADP and AMP was determined under the conditions of the experiments shown in Fig. 1. The results indicate that none of the adenine nucleotides changed significantly ($n = 4$) on varying either glucose (from 4.5 to 5.5 mM) or oxalate (from 0 to 1 mM); with 2 mM oxalate, a 10–30% increase in ATP, ADP and AMP was observed. Thus, these findings support the control distribution of glycolysis (Table 5) derived from the elasticity-based analysis shown in Table 4.

DHAP is certainly connected with nonglycolytic reactions that involve NAD⁺ such as α -glycerophosphate dehydrogenase, which was however, negligible in AS-30D cells (Table 1). Likewise, Fru(1,6)P₂ formation may affect the ATP/ADP ratio, which in turn establishes communication with glycolytic downstream reactions (phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase) and with other energy-dependent reactions (adenylate kinase, ATPases, biosynthetic pathways). Moreover, PFK-1 is activated by AMP (Table 6 and Fig. 2B),

which connects with the adenylate kinase reaction. Therefore, the connectivity theorem used here for the calculation of the flux control coefficients from elasticities towards some intermediates [Eqn 2 in Experimental procedures] was apparently incomplete and too simplistic to describe all interactions, and it may be necessary to consider more complicated relationships [24,43,44].

Notwithstanding the above arguments, the elasticity-based analysis, as used here, revealed that the Glc6P-producing block (GluT and hexokinase) exerted the main control of flux. The finding that the intracellular concentration of free glucose was high and saturating for hexokinase (Table 3) suggests that most of the control exerted by the Glc6P-producing block might reside in hexokinase. Moreover, high over-expression of GluT has been documented for HeLa cells and other human tumor cell types [46,47]. However, before we can conclude that hexokinase is the main controlling step, we should further examine the content and activity of the GluT under physiological conditions, as product inhibition of the GluT activity has not been explored [48].

In HeLa cells, all glycolytic enzymes except LDH were also over-expressed compared with hepatocytes. However, it should be noted that to achieve a more rigorous comparison, a normal proliferating endothelial cell line should be used instead of hepatocytes. The over-expression in HeLa cells was much less than that in AS-30D cells (Table 1); however, the glycolytic rates were similar (Table 2). This was probably due to a high rate of degradation of glycogen (high lactate formation in the absence of added glucose; Table 2) and amino acids (elevated concentration of pyruvate; Table 3), the products of which bypass hexokinase, the presumed main controlling step, to enter the glycolytic pathway.

In HeLa cells, the control of glycolytic flux may also reside in hexokinase, as in normal hepatocytes and AS-30D cells, as well as in PFK-1, because the two enzymes have the lowest $V_{\max}$ values, and they are not highly over-expressed. The eightfold lower concentration of Glc6P in HeLa cells, compared with AS-30D cells, is expected to exert a low or negligible inhibition of hexokinase. The low Glc6P concentration in HeLa cells may be related to a higher activity of the Glc6P branches, glycogen synthesis and pentose phosphate cycle. Indeed, G6PDH activity was 4–7 times higher in HeLa cells than in hepatocytes and AS-30D cells (Table 1).

A higher ATP concentration in HeLa cells than in AS-30D cells suggests a lower activity of ATPases and other ATP-dependent cell processes or, alternatively, that ATP production by oxidative phosphorylation

was faster. Indeed, the rate of oligomycin-sensitive respiration, which reflects the rate of oxidative phosphorylation [40,49], in the presence of 5 mM glucose + 0.6 mM glutamine was 43 ± 4 ng-atoms oxygen $\cdot$ min $^{-1}\cdot 10^{-7}$ cells ($n = 4$) in AS-30D cells and 92 ± 16 ng-atoms oxygen $\cdot$ min $^{-1}\cdot 10^{-7}$ cells ($n = 6$) in HeLa cells. As the enzymatic assay of ADP determines total but not free ADP, the ATP/ADP ratio was not highly reliable as an indicator of the cellular energy status.

There are two α -glycerophosphate dehydrogenase isoenzymes in mammalian cells, one bound to the mitochondrial inner membrane and another in the cytosol, which regulate the cytosolic NADH/NAD $^{+}$ ratio and are involved in the synthesis of triacylglycerols [50]. The activity of the cytosolic isoenzyme decreases or becomes negligible in fast-growth hepatomas [26,27] and AS-30D and HeLa cells (Table 1), which may induce DHAP accumulation (Table 3). An alternative route for triacylglycerol synthesis has been described that does not require α -glycerophosphate. This pathway starts with the acylation of DHAP, in a reaction catalyzed by DHAP acyltransferase, which is present in rat liver, kidney, spleen and adipose tissue; at the subcellular level, this enzyme is localized in the mitochondrial and microsomal fractions [51]. Such a route might be operating in tumor cells.

Biochemical mechanisms underlying the evaluated distribution of flux control

It should be emphasized that the analysis of $V_{\max}$ values only (i.e. cellular content of active enzyme) to reach conclusions on the metabolic pathway control is certainly incomplete, as the enzymatic activities are determined in the absence of their physiological activators and inhibitors, at saturating substrate concentrations, and in the absence of products; these factors discard the role of the reversibility of reactions under physiological conditions on control of flux [52].

Accumulation of products may decrease the forward reaction. In this regard, it is well documented that Glc6P is a potent inhibitor of hexokinase-I, hexokinase-II and hexokinase-III [37]. In consequence, the increased hexokinase activity might be counterbalanced by stronger Glc6P inhibition. One way to circumvent this blockade is to over-express hexokinase-III, an isoenzyme with a higher K_i for Glc6P (0.1 mM). Alternatively, hexokinase binding to mitochondria may protect it against Glc6P inhibition [7,53]. However, the Glc6P inhibition was strong and similar for both mitochondrial and cytosolic hexokinase isoenzymes (Figure 2A), when the activity was assayed under

near-physiological conditions of pH (7.0) and temperature (37 °C) and high concentrations of glucose (> 1 mM) and Glc6P (≥ 1 mM). On the other hand, Nakashima *et al.* [7] and Bustamante *et al.* [53] determined Glc6P inhibition of mitochondrial hexokinase at 22–30 °C, pH 7.9, and in a hypotonic medium with nonphysiological concentrations of glucose (< 1 mM) and Glc6P (< 1 mM). The presence of this Glc6P regulatory mechanism in tumoral hexokinase supports an essential role for this enzyme in the control of flux.

Four hexokinase isoenzymes have been identified in mammalian cells: Type-I, II, III and IV (glucokinase), from which the first three are Glc6P-sensitive [37]. Hexokinase-I and hexokinase-II may bind to the outer mitochondrial membrane, as they have a specific hydrophobic N-terminal segment [54]. Hexokinase-I is predominantly located in brain, kidney, retina and breast, whereas hexokinase-II is abundant in skeletal muscle and adipose tissue [8]. In tumor cells, hexokinase-II is apparently the main over-expressed isoenzyme [7,8,37], except for brain tumors, in which hexokinase-I is over-expressed [8].

Analysis of the hexokinase kinetic properties and subcellular redistribution towards mitochondria suggested that the isoenzyme over-expressed in AS-30D cells was type II, as previously suggested using a similar analysis [7]. The amount of mitochondrial hexokinase in AS-30D (50%) and HeLa cells (70%; data not shown) was also similar to that observed for Novikoff and AS-30D ascites tumor cells of 50–80% [55,56]. This observation explains, at least in part, the enhanced glycolytic flux (Table 2, [8]) and the resistance to apoptosis [11] in these tumor cells.

The kinetic analysis of PFK-1 revealed that the isoenzyme present in AS-30D cells was completely insensitive to the usual allosteric inhibitors, ATP and citrate, in the presence of a low, physiological concentration of Fru(2,6) P_2 , and that it was highly sensitive to the activators NH $_4^{+}$, AMP and Fru(2,6) P_2 . The high, physiological concentration of AMP in AS-30D did not suffice to potently activate PFK-1 in the presence of ATP and citrate. The expression of a PFK-2 isoenzyme with a low fructose-2,6-bisphosphatase activity in several human tumor lines has been described [57,58], which ensures a high concentration of Fru(2,6) P_2 . Indeed, Fru(2,6) P_2 was the most potent activator of PFK-1 and blocked the inhibition by ATP and citrate (Fig. 2B and Table 6, and also [12]).

Therefore, its kinetic properties predict that PFK-1 activity cannot impose a flux limitation on glycolysis in AS-30D cells. Under near-physiological conditions, the estimated elasticity coefficient of PFK-1 for Fru6P was high ($\epsilon_{\text{Fru6P}}^{\text{PFK-1}} = 1.2$), which provides the bio-

chemical mechanism for its low flux control coefficient (Table 5). The PFK-1 elasticity and kinetic properties also provide a biochemical basis for understanding the diminished Pasteur effect observed in AS-30D [49] and other tumor cell types [39].

Experimental procedures

Chemicals

Hexokinase, G6PDH, hexosephosphate isomerase, aldolase, α -glycerophosphate dehydrogenase, triosephosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase and LDH were purchased from Roche Co. (Mannheim, Germany). Recombinant enzymes enolase, pyruvate phosphate dikinase and phosphoglycerate kinase from *Entamoeba histolytica* were kindly provided by E Saavedra, Instituto Nacional de Cardiología, México. Glucose, Glc6P, Fru(1,6)P₂, glyceraldehyde 3-phosphate, 2-phosphoglycerate, phosphoenolpyruvate, Fru(2,6)P₂, pyruvate, citrate, ATP, AMP, ADP, GTP, dithiothreitol, cysteine, NADH, NAD⁺, NADP and oxalate were from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Fru6P and 3-phosphoglycerate were from Roche (Indianapolis, IN, USA). Methoxy[³H]inulin was from Perkin-Elmer Life Sci (Boston, MA, USA). All other reagents were of analytical grade from commercial sources.

Isolation of tumor and liver cells

AS-30D hepatoma cells [(2–4) × 10⁸ cells·mL⁻¹] were propagated in female Wistar rats (200 g) by intraperitoneal transplantation. Hepatoma cells were isolated as described elsewhere [59].

HeLa cells (1.5 × 10⁴ cells·mL⁻¹) were grown in Dulbecco's minimal essential medium (Gibco Life Technologies, Rockville, MD, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 10 000 U·mL⁻¹ streptomycin/penicillin, and fungizone (amphotericin B; Gibco) in 175-cm² flasks (Corning, New York, NY, USA) at 37 °C in 5% CO₂/95%O₂. Hepatocytes were isolated by perfusion of isolated liver with collagenase IV (Worthington, Lakewood, NJ, USA) from fed Wistar rats [60]. The cellular viability assayed by trypan blue exclusion was 80–85%. Experimental manipulation of human and rodent cells and animal specimens were carried out following the Instituto Nacional de Cardiología de Mexico guidelines in accordance with the Declaration of Helsinki and the US NIH guidelines for care and use of experimental animals.

Determination of steady-state concentrations of metabolites

Cells (15 mg protein·mL⁻¹) were incubated in Krebs–Ringer medium with orbital shaking (150 r.p.m.) at 37 °C in a

plastic flask. After 10 min, 5 mM glucose was added to the cell suspension. The reaction was stopped 3 min later with ice-cold perchloric acid (3%, v/v, final concentration). For the determination of the intracellular L-lactate, an aliquot (1 mL) of the cell suspension was rapidly withdrawn and centrifuged at 20 800 g for 10–15 s at room temperature. The supernatant was discarded, and the pellet rinsed with fresh Krebs–Ringer medium and then resuspended in 3% perchloric acid. The samples were neutralized with 3 M KOH/0.1 M Tris. The concentrations of Glc6P, Fru6P, Fru(1,6)P₂, DHAP, glyceraldehyde 3-phosphate, phosphoenolpyruvate, pyruvate, ATP, ADP, AMP, citrate and L-lactate were determined by standard enzymatic assays [61].

Protein was determined by the biuret method using BSA as standard [62].

Determination of intracellular glucose

AS-30D cells (15 mg·mL⁻¹) were preincubated for 10 min in the absence of exogenous substrates at 37 °C. Exogenous glucose was added after 10 min, and the cells were incubated for 3 min more. Afterwards, an aliquot (0.5 mL) was carefully poured into microcentrifuge tubes containing, from bottom to top, 30% (v/v) perchloric acid (0.3 mL), 1-bromododecane (0.3 mL) and fresh Krebs–Ringer medium (0.3 mL). The sample was centrifuged for 2–3 min in a refrigerated Microfuge (Eppendorf centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Germany) at 20 800 g. The bottom layer was collected and neutralized with 10% NaOH. Glucose was determined by enzymatic analysis [61].

To correct for the presence of exogenous glucose from the incubation medium in the cellular pellet, the content of external water was evaluated by using methoxy[³H]inulin. An aliquot of cells (5–30 mg protein·mL⁻¹) was incubated in 0.5 mL Krebs–Ringer medium with [³H]inulin (0.15 mg·mL⁻¹, specific radioactivity 5200 c.p.m.·μg⁻¹) for 15 s. Thereafter, the cell suspension was carefully layered into microcentrifuge tubes prepared as described above. The radioactivity of the bottom layer was measured in a liquid scintillation analyzer (Packard Instruments/Canberra, Meriden, CT, USA). The concentration of glucose carried from the extracellular milieu was 1.28 mM. This value was subtracted from the original intracellular concentration.

Determination of glycolytic flux in liver and tumor cells

Cells (15 mg protein·mL⁻¹) were incubated in 3 mL Krebs–Ringer medium with orbital stirring (150 r.p.m.) at 37 °C in a plastic flask. After 10 min, 5 mM glucose was added to the cells; the reaction was stopped with cold 3% perchloric acid 0 and 3 min later. The samples were neutralized with 3 M KOH/0.1 M Tris. L-Lactate generated was determined by enzymatic analysis [61].

Cell extracts of tumor and liver cells

Cells (65 mg protein·mL⁻¹) were resuspended in 25 mM Tris/HCl buffer, pH 7.6, with 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. The cell suspension was frozen in liquid nitrogen and thawed in a water bath at 37 °C; this procedure was repeated three times. Cell lysates were centrifuged at 39 000 *g* for 20 min and 4 °C. Afterwards, the supernatant was collected for determination of enzyme activity. Activities of hexokinase, hexosephosphate isomerase, PFK-1, triosephosphate isomerase, aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, phosphoglycerate mutase, enolase, pyruvate kinase, LDH, α -glycerophosphate dehydrogenase, phosphoglucomutase and G6PDH were determined spectrophotometrically by standard assays [63,64]. The incubation buffer was 50 mM Mops, pH 7, at 37 °C. Phosphoglycerate kinase activity was determined in 50 mM potassium phosphate, pH 7, at 37 °C. To assay mitochondrial hexokinase, isolated mitochondria were prepared as described elsewhere [59]. The assays for both cytosolic and mitochondrial hexokinase isoenzymes were carried out at 37 °C in 1 mL KME buffer (100 mM KCl, 50 mM Mops, 0.5 mM EGTA, pH 7.0) plus 2 U G6PDH, 1 mM NADP⁺, 5 mM MgCl₂, glucose (from 0.05 to 10 mM) and 1 μ M oligomycin. The reaction was started by the addition of ATP (0.05–5 mM) after 2 min incubation.

Assay for hexokinase inhibition by Glc6P was carried out in 3 mL of KME buffer at 37 °C, in the presence of 3 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 μ M oligomycin and 0.2–1 mM Glc6P. Owing to the high unspecific oxidation of added NADH by the cytosolic-enriched and mitochondrial fractions (despite the addition of rotenone), the activity was calculated from the ADP generated, which was determined by a standard assay [61]. The hexokinase activity was corrected for the ADP formed in the absence of added glucose. Bound and free isoenzymes were preincubated for 2 min, and then the hexokinase reaction was started by adding 3 mM glucose. After 30 s, the reaction was stopped with ice-cold perchloric acid (3%, v/v, final concentration). The samples were neutralized with 3 M KOH/0.1 M Tris. The control activities for both hexokinase isoenzymes were comparable to those determined by the G6PDH coupling assay.

For PFK-1 activity, freshly prepared extracts were incubated at 37 °C in 50 mM Mops, pH 7. The reaction assay contained 0.15 mM NADH, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, Fru6P (from 0.01 to 10 mM) and ammonium sulfate suspensions of the following coupling enzymes: 0.36 U aldolase, 9 U triosephosphate isomerase, and 3.1 U α -glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The reaction was started by the addition of exogenous ATP (from 0.01 to 2 mM). For the determination of $K_{0.5}$ for NH₄⁺, AMP and Fru(2,6)P₂, as well as for the effect of activators and inhibitors, lyophilized (ammonium-free) coupling enzymes were used in KME buffer.

Determination of flux control coefficients

The flux control coefficients (C_{Ei}^J) were determined by using the elasticity-based analysis [31,34,45,65]. This approach quantifies the sensitivity of a given enzyme or block of enzymes to variations in its substrate or product when the steady-state flux is modified. Glycolysis was stimulated by exogenous glucose (4–6 mM) or inhibited by oxalate (0.5–2 mM), 2-deoxyglucose (0.5–10 mM) or arsenite (5–100 μ M). Under these conditions, the variation in the glycolytic flux and in several intermediates was determined. Flux control coefficients were estimated using the connectivity (Eqn 1) and summation theorems (Eqn 2) [24],

$$C_{E1}^J e_m^{E1} + C_{E2}^J e_m^{E2} = 0 \quad (1)$$

$$C_{E1}^J + C_{E2}^J = 1 \quad (2)$$

in which *J* is the glycolytic flux (rate of lactate formation), E1 is the enzyme block that produces the intermediate (*m*) and E2 is the enzyme block that consumes *m*.

Acknowledgements

This work was partially supported by grant no. 43811-Q from CONACyT-México.

References

- Warburg O (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270.
- Zu XL & Guppy M (2004) Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 459–465.
- Dang C & Semenza GL (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* **24**, 68–72.
- Lu H, Forbes RA & Verma A (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* **277**, 23111–23115.
- Osthuis RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA & Dang C (2000) Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* **275**, 21797–21800.
- Gillies RJ, Martinez-Zaguillan R, Martinez GM, Serrano R & Perona R (1990) Tumorigenic 3T3 cells maintain an alkaline intracellular pH under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 7414–7418.
- Nakashima R, Paggi M, Scott LJ & Pedersen PL (1988) Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. *Cancer Res* **48**, 913–919.
- Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF & Hee Ko Y (2002) Mitochondrial bound type II

- hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* **1555**, 14–20.
- 9 Goel A, Mathupala SP & Pedersen PL (2003) Glucose metabolism in cancer. Evidence that demethylation events play a role in activating type II hexokinase gene expression. *J Biol Chem* **278**, 15333–15340.
 - 10 Mathupala SP, Heese C & Pedersen PL (1997) Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* **272**, 22776–22780.
 - 11 Pastorino JG, Shulga N & Hoek JB (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome *c* release and apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 7610–7618.
 - 12 Depré C, Rider MH & Hue L (1998) Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem* **258**, 277–290.
 - 13 Staal GEJ, Kalff A, Heesbeen EC, Van Veelen CWM & Rijksen G (1987) Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase, from human gliomas. *Cancer Res* **47**, 5047–5051.
 - 14 Meldolesi MF, Macchia V & Laccetti P (1976) Differences in phosphofructokinase regulation in normal and tumor rat thyroid cells. *J Biol Chem* **251**, 6244–6251.
 - 15 Oskam R, Rijksen G, Staal GEJ & Vora S (1985) Isozymic composition and regulatory properties of phosphofructokinase from well-differentiated and anaplastic medullary thyroid carcinomas of the rat. *Cancer Res* **45**, 135–142.
 - 16 Vora S, Halper JP & Knowles DM (1985) Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation *in vivo* and *in vitro*: transformation-and progression-linked discriminants of malignancy. *Cancer Res* **45**, 2993–3001.
 - 17 Sánchez-Martínez C & Aragón JJ (1997) Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland. *FEBS Lett* **409**, 86–90.
 - 18 Denis C, Paris H & Murat JC (1986) Hormonal control of fructose-2,6-bisphosphate concentration in the HT29 human colon adenocarcinoma cell line. *Biochem J* **239**, 531–536.
 - 19 Mojeda M, Bosca L & Hue L (1985) Effect of glutamine on fructose-2,6-bisphosphate and on glucose metabolism in HeLa cells and in chick-embryo fibroblasts. *Biochem J* **232**, 521–527.
 - 20 Loiseau AM, Rousseau GG & Hue L (1985) Fructose-2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by glucocorticoids and by other agents in rat hepatoma cells. *Cancer Res* **45**, 4263–4269.
 - 21 Nissler K, Petermann H, Wenz I & Brox D (1995) Fructose-2,6-bisphosphate metabolism in Ehrlich ascites tumour cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **121**, 739–745.
 - 22 Rapoport T, Heinrich R, Jacobasch G & Rapoport S (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *Eur J Biochem* **42**, 107–120.
 - 23 Kashiwaya Y, Sato K, Tsuchiya N, Thomas S, Fell DA, Veech RL & Passonneau JV (1994) Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *J Biol Chem* **269**, 25502–25514.
 - 24 Fell D (1997) *Understanding the Control of Metabolism*. Plenum Press, London.
 - 25 Wu R (1959) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. V. Limiting factors of glycolysis in HeLa cells. *J Biol Chem* **234**, 2806–2810.
 - 26 Harding JW, Pyeritz EA, Morris HP & White HB (1975) Proportional activities of glycerol kinase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in rat hepatomas. *Biochem J* **148**, 545–550.
 - 27 Pedersen PL (1978) Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res* **22**, 190–274.
 - 28 Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* **140**, 1–22.
 - 29 Moreno-Sánchez R & Torres-Márquez ME (1991) Control of oxidative phosphorylation in mitochondria, cells and tissues. *Int J Biochem* **23**, 1163–1174.
 - 30 Groen AK, Wanders RJ, Westerhoff HV, van der Meer R & Tager JM (1982) Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biol Chem* **257**, 2754–2757.
 - 31 Kacser H (1983) The control of enzyme systems *in vivo*: elasticity analysis of the steady state. *Biochem Soc Trans* **11**, 35–40.
 - 32 Moreno-Sánchez R, Bravo C & Westerhoff HV (1999) Determining and understanding the control of flux. An illustration in submitochondrial particles of how to validate schemes or metabolic control. *Eur J Biochem* **264**, 427–433.
 - 33 Groen AK, van Roermund CW, Vervoom RC & Tager JM (1986) Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon. *Biochem J* **237**, 379–389.
 - 34 Hafner RP, Brown GC & Brand MD (1990) Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the ‘top-down’ approach of metabolic control theory. *Eur J Biochem* **188**, 313–319.
 - 35 Thomas S, Mooney PJ, Burrell MM & Fell DA (1997) Metabolic control analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (*Solanum tuberosum*): explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. *Biochem J* **322**, 119–127.
 - 36 Ainscow EK & Brand MD (1999) Top-down control analysis of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Eur J Biochem* **263**, 671–685.
 - 37 Wilson JE (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* **206**, 2049–2057.

- 38 Jannaschk KD, Burgos M, Centerlles JJ, Ovadi J & Cascante M (1999) Application of metabolic control analysis to the study of toxic effects of copper in muscle glycolysis. *FEBS Lett* **445**, 144–148.
- 39 Eigenbrodt E, Fister P & Reinacher M (1985) New perspectives in carbohydrate metabolism in tumor cells. In: *Regulation of Carbohydrate Metabolism* (Reitner, R, ed.), vol. 2, pp 141–179. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 40 Rodríguez-Enríquez S & Moreno-Sánchez R (1998) Intermediary metabolism of fast-growth tumor cells. *Arch Med Res* **29**, 1–12.
- 41 Mazuret S, Eigenbrodt E, Failing K & Steinberg P (1999) Alterations in the glycolytic and glutaminolytic pathways after malignant transformation of rat liver oval cells. *J Cell Physiol* **181**, 136–146.
- 42 Mazuret S, Michel A & Eigenbrodt E (1997) Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *J Biol Chem* **272**, 4941–4952.
- 43 Shuster S, Kahn D & Westerhoff HV (1993) Modular analysis of control of complex metabolic pathways. *Biophys Chem* **48**, 1–17.
- 44 Ainscow EK & Brand MD (1998) Control analysis of systems with reaction blocks that ‘cross-talk’. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 284–290.
- 45 Brown GC, Lakin-Tomas L & Brand MD (1990) Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *Eur J Biochem* **192**, 355–362.
- 46 Kitagawa T, Tsuruhara Y, Hayashi M, Endo T & Stanbridge EJ (1995) A tumor-associated glycosylation change in the glucose transporter GLUT1 controlled by tumor suppressor function in human cell hybrids. *J Cell Sci* **108**, 3735–3743.
- 47 Macheda ML, Rogers S & Best JD (2005) Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* **202**, 654–662.
- 48 Colville C, Seatter MJ, Jess TJ, Gould GW & Thomas HM (1993) Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus oocytes*: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem J* **290**, 701–706.
- 49 Rodríguez-Enríquez S, Juárez O, Rodríguez-Zavala JS & Moreno-Sánchez R (2001) Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur J Biochem* **268**, 2512–2519.
- 50 Houstek J, Cannon B & Lindberg O (1975) Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown adipose tissue. *Eur J Biochem* **54**, 11–18.
- 51 Hajra AK (1997) Dihydroxyacetone phosphate acyl-transferase. *Biochim Biophys Acta* **1348**, 27–34.
- 52 Mendoza-Cozatl DG & Moreno-Sánchez R (2006) Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *J Theor Biol* **238**, 919–936.
- 53 Bustamante E & Pedersen PL (1977) High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 3735–3739.
- 54 Smith TAD (2000) Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br J Biomed Sci* **57**, 170–178.
- 55 Arora KK & Pedersen PL (1988) Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. *J Biol Chem* **263**, 17422–17428.
- 56 Parry DM & Pedersen PL (1983) Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. *J Biol Chem* **258**, 10904–10912.
- 57 Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R & Bucala R (2002) High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res* **62**, 5881–5887.
- 58 Chesney J, Mitchell R, Benigni F, Bacher M, Spiegel L, Al-Abed Y, Han JH, Metz C & Bucala R (1999) An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3047–3052.
- 59 López-Gómez F & Torres-Márquez & Moreno-Sánchez R (1993) Control of oxidative phosphorylation in AS-30D hepatoma mitochondria. *Int J Biochem* **25**, 373–377.
- 60 Berry MN & Friend DS (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* **43**, 506–520.
- 61 Bergmeyer HU (ed.) (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- 62 Gornall AG, Bardwill CJ & David MM (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J Biol Chem* **177**, 751–766.
- 63 Bergmeyer HU (ed.) (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- 64 Saavedra E, Encalada R, Pineda E, Jasso-Chávez R & Moreno-Sánchez R (2005) Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS J* **272**, 1767–1783.
- 65 Tager JM, Wanders JA, Groen AK, Kunz W, Bohnen-sack R, Küster U, Letko G, Böhme G, Duszynski J & Wojtczak L (1983) Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett* **151**, 1–9.
- 66 Simpson RJ, Brindle KM, Brown FF, Campbell ID & Foxall DL (1982) Studies of lactate dehydrogenase in the purified state and in intact erythrocytes. *Biochem J* **202**, 581–587.
- 67 Meunier JC & Dalziel K (1978) Kinetics studies of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. *Eur J Biochem* **82**, 483–492.

Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells

Sara Rodríguez-Enríquez^{a,*}, Paola A. Vital-González^a, Fanny L. Flores-Rodríguez^a,
Alvaro Marín-Hernández^a, Lena Ruiz-Azuara^b, Rafael Moreno-Sánchez^a

^a Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México

^b Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, UNAM, México

Received 18 October 2005; revised 27 January 2006; accepted 13 February 2006

Available online 31 March 2006

Abstract

The relationship between cell proliferation and the rates of glycolysis and oxidative phosphorylation in HeLa (human) and AS-30D (rodent) tumor cells was evaluated. In glutamine plus glucose medium, both tumor lines grew optimally. Mitochondria were the predominant source of ATP in both cell types (66–75%), despite an active glycolysis. In glucose-free medium with glutamine, proliferation of both lines diminished by 30% but oxidative phosphorylation and the cytosolic ATP level increased by 50%. In glutamine-free medium with glucose, proliferation, oxidative phosphorylation and ATP concentration diminished drastically, although the cells were viable. Oligomycin, in medium with glutamine plus glucose, abolished growth of both tumor lines, indicating an essential role of mitochondrial ATP for tumor progression. The presumed mitochondrial inhibitors rhodamines 123 and 6G, and casiopeina II-gly, inhibited tumor cell proliferation and oxidative phosphorylation, but also glycolysis. In contrast, gossypol, iodoacetate and arsenite strongly blocked glycolysis; however, they did not affect tumor proliferation or mitochondrial metabolism. Growth of both tumor lines was highly sensitive to rhodamines and casiopeina II-gly, with IC_{50} values for HeLa cells lower than 0.5 μ M, whereas viability and proliferation of human lymphocytes were not affected by these drugs ($IC_{50} > 30 \mu$ M). Moreover, rhodamine 6G and casiopeina II-gly, at micromolar doses, prolonged the survival of animals bearing i.p. implanted AS-30D hepatoma. It is concluded that fast-growing tumor cells have a predominantly oxidative type of metabolism, which might be a potential therapeutic target.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Antineoplastic drugs; AS-30D hepatoma cells; HeLa cells; Glycolysis; Metabolic therapy; Oxidative phosphorylation

Introduction

Fast-growing tumor cells exhibit increased rates of glycolysis due to enhanced mRNA transcription, enzyme over-expression (Shim et al., 1997; Osthus et al., 2000) and the absence of an efficient oxidative phosphorylation pathway (OxPhos) (Pedersen, 1978; Eigenbrodt et al., 1985; Baggetto, 1992). These observations imply that the blocking of the glycolysis pathway should arrest tumor progression. Consequently, research into the intermediary metabolism for treatment of cancer has been governed by this notion.

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, México. Fax: +52 5 55 5730926.

E-mail address: rodsar@mail.cardiologia.org.mx (S. Rodríguez-Enríquez).

In this regard, drugs that inhibit glycolysis such as 2-deoxyglucose, 3-mercaptopicolinic acid, lonidamine, clotrimazole and cyclophosphamide have been used to diminish growth of several carcinomas (HeLa, Walker-256, MCF-7, Lewis, CT-26) and fibrosarcomas (RF-1) (Lampidis et al., 1983; Fearon et al., 1987; Fanciulli et al., 1996; Penso and Beitner, 2002; Poptani et al., 2003; Izyumov et al., 2004). However, few encouraging results have been obtained from these studies due to the low drug efficiency and the severe side effects observed in the host (De Martino et al., 1987; Pulselli et al., 1996; Vivi et al., 1997).

OxPhos may also play an important role in the ATP supply for cellular proliferation. Thus, the tumor energy metabolism has been proposed as a target for antineoplastic therapy, through simultaneous inhibition of glycolysis and OxPhos (Lampidis et al., 1983; Fearon et al., 1987; Jaroszewski et al., 1990; Izyumov et al., 2004). Interestingly, the addition of both glycolytic (2-

deoxyglucose, gossypol, 3-mercaptopicolinic acid) and oxidative inhibitors (rhodamines 123 and 6G) suppresses the growth of several carcinomas (Walker 256, MCF-7 cells) and liver-implanted VX2 tumors, by 50–100% (Fearon et al., 1987; Jaroszewski et al., 1990; Geschwind et al., 2002).

Other metabolic drugs such as clofazimine, MKT-077, F16, emodin and ceramide (Sri-Pathmanathan et al., 1994; Weisberg et al., 1996; Gudiz et al., 1997; Fantin et al., 2002; Jing et al., 2002) have shown potent uncoupling or inhibitory effect on OxPhos in isolated mitochondria, culture cells and in vivo models, together with inhibition of tumor cell proliferation. Furthermore, the antineoplastic effect of taxol, methoxyestradiol, mofarotene and salsolinol may also involve diminution of the mitochondrial membrane potential in culture cells (Storch et al., 2000; Cariati et al., 2003; Park et al., 2004) and isolated mitochondria (Hagen et al., 2004). Non-steroidal anti-inflammatory drugs such as meloxicam and nimesulide (Moreno-Sánchez et al., 1999), and copper-based antineoplastic drugs such as casiopeinas (Marín-Hernández et al., 2003) also exhibit potent inhibitory effect on the oxidative metabolism of fast-growing hepatoma AS-30D. Unfortunately, assessment of the inhibitory ability of some of these metabolic inhibitors on the oxidative pathways of the tumor cell lines has not been evaluated in parallel with their effects on cell growth.

In this regard, in AS-30D hepatoma cells (Rodríguez-Enriquez et al., 2000), a tumor line previously described as of the glycolytic type (Nakashima et al., 1984), we have shown that OxPhos provides most of the ATP (>98%) required for the cellular processes during the onset of tumor proliferation. Then, it may be hypothesized that inhibition of OxPhos in AS-30D hepatoma could be a complementary strategy for lowering its active cellular proliferation. Energy metabolism of rodent fast-growing tumor cells might be different from that of human origin. However, growth of HeLa cells, a fast-growing human cancer cell line, seems mainly supported by glutamine (Reitzer et al., 1979), a mitochondrial oxidizable substrate. Therefore, the aim of the present work was to determine the extent to which the growth of AS-30D hepatoma and HeLa cells depended upon the ATP supply from glycolysis and mitochondrial function. Once the prevalent energy metabolism was established in both tumor cells, the following step was to modulate the ATP supply and cellular growth by changing substrates (glucose, glutamine or both) or by using inhibitors of glycolysis or OxPhos. Finally, this approach was upgraded to the tumor-bearing animal model to evaluate whether the inhibition of the predominant ATP-producing pathway could be a strategy to inhibit the accelerated proliferation of fast-growing tumor cells.

Materials and methods

Cell types. AS-30D hepatoma cells were propagated by intraperitoneal inoculation in 250 g female Wistar rats as described elsewhere (Rodríguez-Enriquez et al., 2000). The cells were preserved under sterile conditions at -72°C in the presence of 10% dimethyl sulfoxide. Analysis of oxygen consumption, phosphometabolite content and glycolysis revealed that hepatoma cells remained unaltered in their metabolic characteristics after 300–350 passages in vivo. Lymphocytes were isolated from non-smoking blood donor volunteers, who were informed about the aim of this study and the experimental details. Blood was obtained by venopuncture; lymphocytes were isolated by using a

centrifugation step with Histopaque (ICN, Aurora, Ohio), according to the procedure described by the manufacturer. Immediately after isolation, the cells were suspended in RPMI 1640 medium (GIBCO Life Technologies, Rockville, MD).

Cell culture conditions. Primary cultures of AS-30D tumor cells were established from cells isolated from freshly extracted AS-30D ascites tumor. Cells were isolated by differential centrifugation under sterile conditions as previously described (Rodríguez-Enriquez et al., 2000). Aliquots of AS-30D cells and HeLa cells were grown in glucose- and glutamine-free Dulbecco's minimal essential medium (GIBCO), supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), 10,000 U streptomycin/penicillin and fungizone (amphotericin B; GIBCO). Glucose (25 mM), glutamine (5 mM) or glutamate (10 mM) (GIBCO), plus 2.5 μM oligomycin (Sigma Chem.) were added to the media at the final concentrations indicated under Results.

For cell proliferation, AS-30D hepatoma cells were cultured in 50 ml-conic centrifuge tubes by using an initial inoculum of 1×10^6 cells/ml. HeLa cells were cultured in 25 or 75 cm^2 -flasks or in 24-multiwell plates (both from Corning, NY), and the experiments were started with an inoculum of 1.5×10^4 cells/ml. AS-30D hepatoma cells were cultured at 37°C in 5% CO_2 , 95% O_2 , under gentle constant agitation (12–20 oscillations per min), whereas HeLa cells were cultured under similar conditions without agitation. Human primary lymphocytes were cultured in 24-multiwell plates at 2×10^4 cells/ml in the presence of lectin (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 5% CO_2 , 95% O_2 , at 37°C . To avoid depletion of nutrients and growth factors, fresh medium was replenished every day.

Determination of oxidative and glycolytic fluxes and cellular ATP concentration. HeLa cells were removed from each flask with trypsin/EDTA (GIBCO) after 72 or 96 h of culture, whereas AS-30D hepatoma cells were collected after 24 or 48 h of culture. Both tumor lines were washed with cold Krebs–Ringer buffer (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.4 mM CaCl_2 , 1 mM H_2PO_4 , 25 mM HEPES, pH 7.4).

For glycolytic flux under near-physiological conditions, tumor cells ($3\text{--}5 \times 10^6$ cells/ml) were incubated for 1 and 10–11 min at 37°C in the presence of 0.6 mM glutamine, 5 mM glucose and the indicated concentration of a metabolic inhibitor. Afterwards, the reaction was stopped with 3% perchloric acid (Rodríguez-Enriquez et al., 2000). The glycolytic flux was determined by measuring the increase in lactate, using a standard enzymatic assay (Bergmeyer and Bernt, 1974). For OxPhos flux, tumor cells (1×10^7 cells/ml) were incubated under orbital shaking of 150 rpm for 10 min at 37°C in the same medium with 0.6 mM glutamine, 5 mM glucose and the indicated concentration of a metabolic inhibitor. Then an aliquot of $3\text{--}5 \times 10^6$ cells/ml was transferred to the oxymeter chamber which contained air-saturated fresh Krebs–Ringer medium with 0.6 mM glutamine, 5 mM glucose and the indicated concentration of a metabolic inhibitor (to avoid dilution). The rate of OxPhos was determined by measuring the oligomycin-sensitive O_2 uptake with a Clark-type electrode at 37°C (Rodríguez-Enriquez et al., 2000). Under these conditions, a linear correlation between rate of O_2 uptake and cellular density (from 3×10^6 up to 15×10^6 cells/ml) was attained.

For the extraction of the intracellular ATP, the cells were mixed with cold 3% perchloric acid and neutralized with 3 M KOH–0.1 M Tris. The ATP content was determined by using the hexokinase/glucose 6-phosphate dehydrogenase assay (Bergmeyer, 1983).

Proliferation rates and toxicity indexes of metabolic inhibitors. The OxPhos inhibitors (rhodamine 123, rhodamine 6G, nimesulide, rotenone, oligomycin, casiopeina II-gly, casiopeina III-i) or glycolytic inhibitors (iodoacetate, gossypol or arsenite) were added to the glutamine + glucose medium at the beginning of the primary culture of AS-30D cells. For HeLa cells and lymphocytes, inhibitors were added 3 h after the beginning of each passage to allow the cells to become attached to the bottom of the well. Cellular densities were determined by using a hemacytometer. The viability of both tumor lines was estimated by 0.5% trypan blue exclusion. The drug toxicity indexes (IC_{50}) on proliferation of HeLa, AS-30D hepatoma cells and human lymphocytes were determined by measuring the cellular density and viability after 48 h (AS-30D), 72 h (human lymphocytes) or 96 h (HeLa) of culture in the presence of different concentrations of inhibitor.

Effect of rhodamine 6G and casiopeina II-gly on in vivo AS-30D tumor progression. AS-30D tumor cells (6×10^8 cells) were implanted i.p. in 250 g female Wistar rats. Drug administration (day 0) was initiated 5–10 min after tumor implantation. Rhodamine 6G and casiopeina II-gly were dissolved in 5 ml sterile PBS (phosphate buffer saline) at a final concentration of $15 \mu\text{M}$ ($30 \mu\text{g/kg}$). The total volume injected was 1 ml. The drugs were also administered on days 2, 4 and 6 after tumor implantation. The i.p. ascites liquid generated after 7 days was removed for determination of tumor cell density.

Statistical analysis. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) with the number of different preparations assayed between parentheses. Differences were considered as significant when at least a $P < 0.05$ value was obtained by the Student's t test for non-paired samples.

Results

Effect of the carbon source on the proliferation of AS-30D hepatoma and HeLa cells

The highest cellular density of both tumor lines was attained in the glucose plus glutamine (gln + gluc) medium (Fig. 1). Under this condition, AS-30D cells reached the stationary phase after 34 h and remained stable for at least 14 h, whereas cellular viability was maintained up to 98% (data not shown); the generation time was 7.2 ± 2 h ($n = 3$). HeLa cells reached the stationary phase after 90 h of culture in the gln + gluc medium with a generation time of 20 ± 6 h ($n = 3$), keeping a viability up to 98% (data not shown).

In the gln or glutamate rich-medium without glucose, AS-30D cellular density diminished by 30 and 50% ($P < 0.005$), respectively (Fig. 1A). Similarly, HeLa cell proliferation decreased by 23% in the gln-rich medium without glucose although cell viability was high (97%, $n = 2$) (Fig. 1B). In contrast, it was only in the glucose-rich medium that both tumor lines were unable to grow, although a high cellular viability was maintained ($83 \pm 3\%$ for AS-30D cell, $n = 3$; and 97% for HeLa cells, $n = 2$). The mitochondrial ATP synthase inhibitor oligomycin ($2.5\text{--}5 \mu\text{M}$) allowed HeLa cells to adhere to the bottom of the well. It has been reported that $5 \mu\text{M}$ oligomycin arrests the cellular cycle progression in Jurkat T cells and diminishes viability, without affecting non-tumorigenic cells (Ferrari et al., 1998). In AS-30D and HeLa cells, oligomycin abolished growth (Fig. 1), indicating that mitochondrial ATP was essential for tumor progression. This last observation discounted the possibility that the low proliferation rate observed in the cells grown in the gln-free medium with glucose was due to nitrogen shortage.

Effect of glucose and glutamine on oxidative phosphorylation and intracellular ATP concentration in AS-30D hepatoma cells

AS-30D cells grown in the gln + gluc medium and harvested during the logarithmic or stationary phases showed a relatively high and similar cellular respiration, which was 85–90% oligomycin-sensitive, i.e., respiration exclusively destined to ATP synthesis (Table 1). A similar pattern of cellular respiration was established for freshly obtained AS-30D cells (Rodríguez-Enríquez et al., 2000). These control rates of respiration of both tumor lines were similar to values reported by other authors for

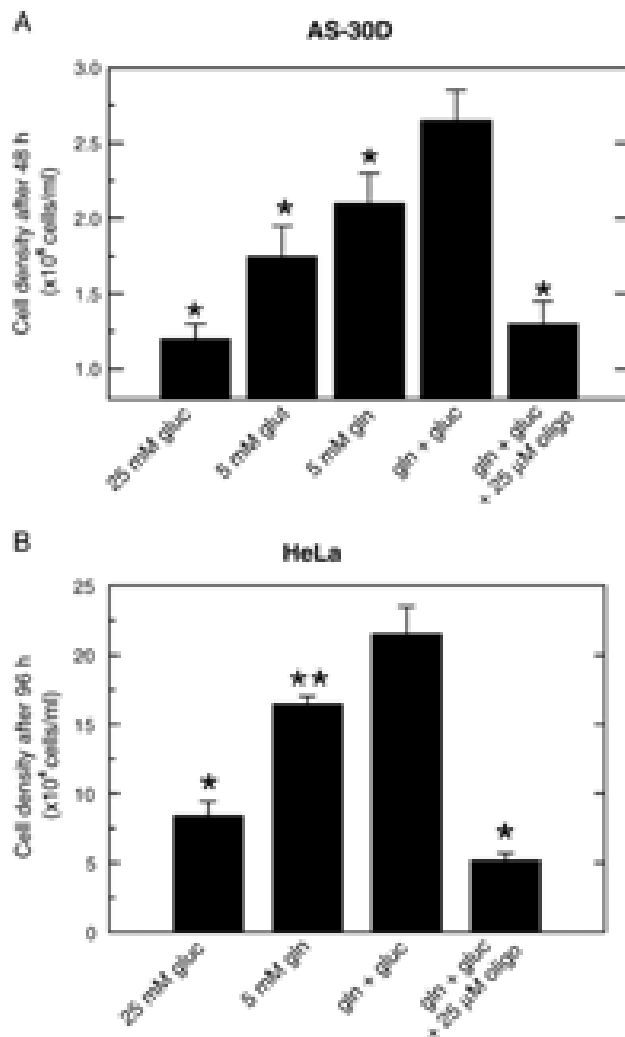


Fig. 1. Effect of different carbon sources on cell proliferation of AS-30D hepatoma (A) and HeLa cells (B). For AS-30D hepatoma cells, the cultures were started with 1×10^6 cells per ml. Cell density is given as the mean of three different experiments $\pm$ SD, except for that with glutamate ($n = 2$). For HeLa cells, the cultures were started with 1.5×10^4 cells per well. Cell density is given as the mean of 2 different experiments $\pm$ SD (8 wells per condition). The substrate concentrations used are indicated below the bars. For AS-30D cells, the viability under each experimental condition was $98 \pm 1\%$, except for that with glucose in which viability was $83 \pm 3\%$. For HeLa cells, the viability was higher than 95%. Abbreviations: glucose (gluc), glutamine (gln), glutamate (glut), oligomycin (oligo). * $P < 0.005$ vs. gln + gluc. ** $P < 0.01$ vs. gln + gluc. Care was taken to maintain the pH of the culture medium above 7.0.

AS-30D or other tumor cell lines using the same methodology (Medina et al., 1988; Rossignol et al., 2004). In cells cultured in a gln-rich medium, oligomycin-sensitive respiration increased by 50%, suggesting de-inhibition of OxPhos due to the absence of glucose. Indeed, exogenous glucose inhibited respiration of both AS-30D and HeLa cells cultured in gln + gluc medium by 60 ± 15 ($n = 3$) and 20 ± 5 ($n = 3$)%, respectively, indicating the presence of the Crabtree effect, a common phenomenon in tumor cells (Rodríguez-Enríquez et al., 2001). Increased respiration correlated well with elevation in the intracellular content of ATP (Table 1).

In contrast, AS-30D cells cultured in the glucose-rich medium maintained a low respiratory activity, which was

Table 1
Relationship between oxidative phosphorylation and ATP concentration in primary cultures of AS-30D hepatoma cells

Carbon source	Cellular respiration (nanogram atoms oxygen/min/10 ⁷ cells)		ATP concentration	
	A	B	nmol ATP/10 ⁷ cells	mM
gln + gluc	91 ± 5 (4)	12 ± 0.6 (4)	1.7 ± 0.4	0.7 ± 0.2 (5)
gln + gluc**	86 (2)	18 (2)	1.5	0.6 (2)
gln	138 ± 20 * (4)	21 ± 3 * (4)	2.8 ± 1 *	1.2 ± 0.4 *(4)
gluc	0 ± 0 * (4)	21 ± 7 * (4)	0.4 ± 0.1 *	0.2 ± 0.04* (4)

AS-30D hepatoma cells were harvested after 24** or 48 h of culture and washed with cold Krebs–Ringer solution as described under Materials and methods. The rates of oligomycin-sensitive (A) and oligomycin-resistant (B) respiration were determined in the absence of added substrates. The values represent the mean ± SD, with the number of different preparations used shown between parentheses. Estimation of molar concentrations was made by assuming an intracellular volume of 2.28 µl/10⁷ cells in AS-30D hepatoma (Rodríguez-Enriquez et al., 2000). Abbreviations: glutamine + glucose (gln + gluc); glutamine (gln); glucose (gluc).

* $P < 0.05$ vs. gln + gluc.

completely insensitive to oligomycin, i.e., respiration was not associated with mitochondrial ATP synthesis (Table 1). This behavior was accompanied by a significant lowering of 70% in the ATP concentration. These findings indicated an essential role of OxPhos for the cell supply of ATP, with glycolysis playing a minor role (see Table 2 for additional

supporting evidence on negligible glycolysis role). When the cells were cultured in gln + gluc plus oligomycin, the OxPhos rate and ATP concentration were undetectable (data not shown). This last result correlated with the lower cellular density attained in the presence of oligomycin (Fig. 1).

Table 2
Effect of several drugs on oxidative phosphorylation and glycolysis in AS-30D hepatoma and HeLa cells

	AS-30D hepatoma (nmol ATP/min/10 ⁷ cells)		HeLa cells (nmol ATP/min/10 ⁷ cells)	
	Oxidative phosphorylation	Glycolysis	Oxidative phosphorylation	Glycolysis
Control				
Stationary	106 ± 11 (4)	51 ± 1 (3)	230 ± 39 (6)	67 ± 12 (4)
Exponential	100 (2)	42 (2)	201 (2)	47 ± 8 (3)
Rhod 123				
Stationary	38 ± 12 **	5 ± 5 ** (3)	94 ± 34 ** (6)	12.5 ± 5 ** (3)
Exponential	46 (1)	16 (2)	127 (2)	18 ± 7 (3)
Rhod 6G				
Stationary	37 ± 11 ** (4)	27 ± 10 ** (3)	95 ± 12 ** (6)	4 ± 4 ** (3)
Exponential	49 (2)	18 (2)	118 (2)	
Casio II				
Stationary	65 ± 10 ** (4)	25 ± 6 ** (3)	57 ± 4 ** (6)	39 ± 6 ** (3)
Exponential	76 (2)	26 (2)	62 (2)	31 ± 24 (3)
Casio III				
Stationary	110 ± 28 ^a (3)	50 ± 5 ^a (3)	210 ± 13 ^a (6)	79 ± 8 ^a (3)
Arsenite				
Stationary	111 ± 13 ^a (4)	25 ± 5 ** (3)	214 ± 13 ^a (3)	20 ± 13 ** (3)
Exponential	93 (2)	12 (2)	207 (2)	12 (2)
IAA				
Stationary	103 ± 19 ^a (3)	25 ± 4 ** (3)	183 ± 46 ^a (5)	10 ± 3 ** (3)
Exponential	101 (2)	15 (2)	206 (2)	11 ± 2 (3)
Goss				
Stationary	111 ± 12 ^a (4)	21 ± 5 ** (3)	203 ± 55 ^a (5)	28 ± 17 *(3)

Tumor cells were grown in gln + gluc medium. The indicated inhibitors were added as described under Materials and methods. Cells were harvested in the exponential (24 h for AS-30D; 72 h for HeLa) and stationary (48 h for AS-30D; 96 h for HeLa) growth phases and washed with cold Krebs–Ringer. Respiration and glycolysis of both tumor cells were determined as described under Materials and methods. The inhibitor concentrations used for AS-30D cells were 100 µM each of IAA, goss or arsenite and 10 µM each of rhod 123, rhod 6G, casio II or casio III. For HeLa cells, the concentrations used were 10 µM each of IAA, arsenite, goss or casio III, and 1 µM each of rhod 123, rhod 6G or casio II. Oxidative phosphorylation was estimated from the rate of oligomycin-sensitive respiration and assuming a P/O ratio of 2.5 (Nakashima et al., 1984). In the absence of exogenous oxidizable substrates, the respiratory rates of HeLa cells (with or without inhibitor) reached similar values than those of cells incubated with glucose plus glutamine. Each value represents the mean ± SD, with the number of experiments assayed shown in parentheses. For each experimental condition, 0.1 ml aliquots were taken before, during and after starting the reaction for viability determination by staining with trypan blue. For both tumor lines, the viability was higher than 95% in control; for + goss and + IAA viability was up to 90%; for + casio III viability was up to 60%; for rhod 123, rhod 6G and casio II viability was lower than 10%. Abbreviations: iodoacetate (IAA), gossypol (goss), rhodamine 123 (rhod 123), rhodamine 6G (rhod 6G), casiopeina II-gly (casio II), casiopeina III-i (casio III).

^a Not significantly different from control value.

* $P < 0.01$ vs. control.

** $P < 0.005$ vs. control.

Effect of metabolic inhibitors on tumor cellular proliferation, glycolysis and OxPhos

To prove the hypothesis that proliferation of fast-growing tumor cells is highly sensitive to OxPhos inhibitors and uncouplers, but not to glycolytic inhibitors, the effect of several drugs was tested on the growth of AS-30D and HeLa cells during the exponential and stationary phases. To determine the rates of OxPhos and glycolysis under near-physiological conditions, HeLa and hepatoma cells were incubated for 10 min in the Krebs–Ringer medium supplemented with 0.6 mM glutamine and 5 mM glucose (Table 2), concentrations found for these oxidizable substrates in rat and human blood (Stahl and Frick, 1978). For both tumor cells, the fluxes of glycolysis and OxPhos in the absence, or in the presence of metabolic inhibitors, were similar during the exponential or stationary phases (Table 2). As HeLa cells were more sensitive to OxPhos and glycolytic inhibitors, these cells were cultured with inhibitor concentrations one order of magnitude lower than that used for hepatoma cells (Fig. 1B; Table 2).

To ensure interaction of drugs with their specific sites, the tumor cells were incubated with the drugs for 10 min. Short-term incubation (1–2 min) of both tumor cells with the drugs reached the same inhibition percentages of OxPhos as those determined with longer incubation times (see Table 2).

Low concentrations of rhodamines and casiopeina II-gly drastically reduced the cellular proliferation and OxPhos of HeLa (nanomolar) and AS-30D cells (micromolar), respectively (Table 3). Nimesulide, at micromolar concentrations, also affected AS-30D cell proliferation (data not shown). The rate of oligomycin-sensitive respiration in HeLa cells and AS-30D hepatoma was similar in the absence of added exogenous substrates (80 ± 15 , $n = 3$ and 91 , $n = 2$ ngAO/min/ 10^7 cells, respectively). However, the presence of exogenous glucose promoted a drastic diminution in AS-30D OxPhos (from 80 ± 15 , $n = 3$, to 43 , $n = 2$, ng atoms oxygen/min/ 10^7 cells) and, therefore, in the contribution of the pathway to the content of cellular ATP (Table 2). The OxPhos inhibition together with the glycolysis stimulation by exogenous glucose caused the OxPhos contribution to the ATP supply to diminish to 67–70%

in AS-30D cells during the exponential and stationary growth phases (see Table 2).

HeLa cells exhibited a lower sensitivity to exogenous glucose; therefore, ATP supply from OxPhos was slightly higher (77–81%). In spite of the increased glycolytic rate and diminution of mitochondrial function induced by the presence of external glucose, the highest ATP contribution came from mitochondria, suggesting that both tumor lines mostly depended on oxidative metabolism. Thus, OxPhos contribution to the cellular ATP supply predominated both in the absence and in the presence of external glucose. The values of OxPhos and glycolysis rates shown in Table 2 were very similar to those found in other fast-growing tumor lines, such as hepatoma Reuber H-35, hepatoma Morris 7793 or mouse fibrosarcoma 1929 (Rossignol et al., 2004; Zu and Guppy, 2004).

Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton seed, inhibits NAD(P)^+ -dependent enzymes, particularly lactate and glyceraldehyde 3-P (GAPDH) dehydrogenases (Qian and Wang, 1984). Arsenite and iodoacetic acid inhibit GAPDH (Ikehara et al., 1984; Dixon, 1997). These three glycolytic inhibitors drastically diminished the glycolytic flux in HeLa cells (>70%), whereas AS-30D hepatoma was somewhat resistant (only 50% inhibition) (Table 2). However, neither gossypol, iodoacetate nor arsenite severely affected cellular viability, proliferation and oligomycin-sensitive respiration of AS-30D hepatoma and HeLa cells (Fig. 2), indicating a negligible part played by glycolysis on the ATP supply for cell proliferation. The cationic lipophilic molecules, rhodamines and casiopeina II-gly, blocked both OxPhos and glycolytic activities in AS-30D hepatoma and HeLa cells (Table 2), suggesting that glycolysis depended on mitochondrial function (i.e., ATP for glucose phosphorylation) or that these drugs could also directly affect some glycolytic enzymes. As these drugs also affected viability and proliferation of tumor cells, the data suggested a strong correlation between OxPhos and cell proliferation.

The potency of the glycolytic and mitochondrial drugs on proliferation and ATP availability of HeLa and AS-30D cells was evaluated (Table 3). Rotenone, oligomycin, rhodamine 6G and rhodamine 123 were the most potent drugs in both tumor

Table 3
Toxicity index (IC_{50}) of several drugs affecting energy metabolism on cellular proliferation and ATP content of AS-30D hepatoma and HeLa cells

	Cellular density IC_{50} μM			Decrease in the ATP content by IC_{50} doses (%)	
	AS-30D	HeLa	Lymphocytes	AS-30D	HeLa
goss	198 ± 60 (3)	6 ± 3 (3)	44.5 (2)		
IAA	99 ± 21 (3)	24 ± 8 (3)			
rhod 123	2 ± 1 (3)	0.09 ± 0.03 (3)	35 ± 10 (4)	$53 \pm 17^*$ (3)	$39 \pm 7^*$ (3)
rhod 6G	0.9 ± 0.7 (3)	0.13 ± 0.05 (4)	34 ± 7 (4)	$47 \pm 23^*$ (3)	$65 \pm 6^*$ (3)
nime	28.5 ± 10 (3)	30.8 (2)			
rote	0.3 ± 0.02 (3)	0.35 ± 0.13 (5)		$47 \pm 6^*$ (3)	$64 \pm 20^*$ (3)
oligo	0.6 ± 0.1 (3)	2.5 (2)			
casio II	3.5 ± 1.3 (3)	0.4 ± 0.2 (5)	34 ± 12 (4)	$41 \pm 12^*$ (3)	$60 \pm 9^*$ (3)
casio III	21.4 ± 6 (3)	6 ± 3 (4)			

For AS-30D hepatoma, the cellular ATP content was normalized vs. the ATP content determined without inhibitor (see Table 1: 1.7 ± 0.4 nmol/ 10^7 cells). For HeLa cells, the ATP content without inhibitor was 8.3 ± 1 nmol/ 10^7 cells ($n = 4$). Abbreviations: iodoacetate (IAA), gossypol (goss), rhodamine 123 (rhod 123), rhodamine 6G (rhod 6G), nimesulide (nime), rotenone (rote), oligomycin (oligo), casiopeina II-gly (casio II), casiopeina III-i (casio III).

* $P < 0.005$ vs. control.

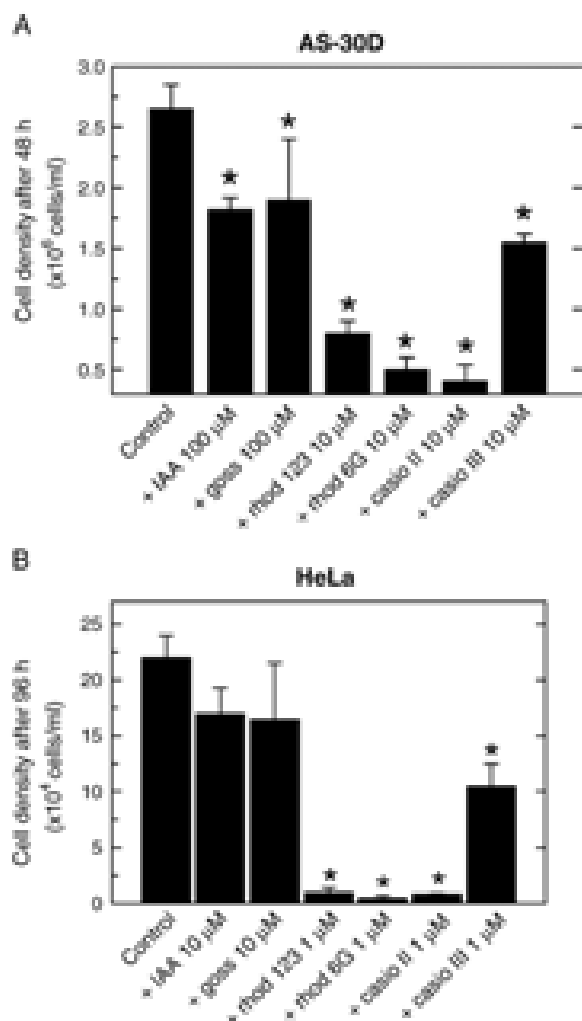


Fig. 2. Effect of different oxidative and glycolytic inhibitors on cell proliferation of AS-30D hepatoma and HeLa cells. AS-30D tumor cells (1×10^6 cells/ml) and HeLa cells (1.5×10^4 cells/ml) were grown in gln + gluc medium without inhibitor (control) or in the presence of different drugs. The concentration of each inhibitor is indicated below the bars. The cellular density was determined after 48 h (AS-30D hepatoma) or 96 h (HeLa cells). For AS-30D, cell densities are given as the mean of at least three independent experiments $\pm$ SD. The viability was higher than 95% in control, and + goss conditions; for + IAA and + casio III, viability was 86 ± 4 and $50 \pm 8\%$, respectively; for rhod 123, rhod 6G and casio II, viability was lower than 10%. For HeLa cells, densities are given as the mean of two experiments (8 wells per condition) $\pm$ SD; except gossipol ($n = 3$ experiments or 9 well per condition). The viability was higher than 97% in control, + IAA and + goss, 53% with casio III and less than 5% with casio II and rhod 123 and 6G. Abbreviations: iodoacetate (IAA), gossypol (goss), rhodamine 123 (rhod 123), rhodamine 6G (rhod 6G), casiopeina II-gly (casio II) and casiopeina III-i (casio III). * $P < 0.005$ vs. control.

cell lines, followed by casiopeina II-gly. The IC_{50} values for rhodamine 123 and gossypol were in the same range as that reported for other oxidative tumor lines such as A-2780 (a human ovarian carcinoma), human melanoma and MCF-7 cells (Jaroszewski et al., 1990). The diminution in the proliferation rate of both tumor cells induced by these drugs correlated with the lowering in the ATP content ($\geq 50\%$). The ATP level determined in HeLa cells (3.5 mM) was in the same range as that reported by Ikehara et al. for the same tumor type (3–4 mM). These data indicated that low doses of either rotenone,

rhodamines or casiopeina II-gly may suffice to promote a significant diminution in the total ATP, and in consequence a diminution in the tumor growth. HeLa cells showed a higher sensitivity to gossypol than AS-30D hepatoma cells (Table 3).

Likewise, the IC_{50} values determined on cellular viability for several drugs were in the same range as that calculated for cellular proliferation. Thus, rhodamine 123 ($IC_{50} = 0.43 \pm 0.26 \mu\text{M}$, $n = 4$), rhodamine 6G ($IC_{50} = 0.24 \pm 0.2 \mu\text{M}$, $n = 4$) and casiopeina II-gly ($IC_{50} = 0.53 \pm 0.7 \mu\text{M}$, $n = 4$) severely affected HeLa cells viability at low doses in comparison with glycolytic drugs such as IAA ($IC_{50} = 19 \pm 7$, $n = 4$).

Rhodamine 123, rhodamine 6G and casiopeina II-gly did not affect cellular proliferation or viability of human lymphocytes. The IC_{50} values for these drugs were higher than 30 μM (Table 3). A similar IC_{50} value for amiodarone on cellular proliferation has been described in human lymphocytes (Fromenty et al., 1993). Lymphocytes were more sensitive to glycolytic drugs than AS-30D cells, possibly due to their higher dependence on glycolysis for ATP supply (Wu and Greene, 1992).

Antitumor activity of rhodamine 6G and casiopeina II-gly in AS-30D hepatoma-bearing animals

The survival of tumor-bearing rats was analyzed, in order to test that the drug inhibitory effects on the energy metabolism observed in suspensions or cultures of tumor cells may be extended to a more complex and realistic model.

The survival time of AS-30D hepatoma-bearing rats was 7 days after i.p. tumor implantation, with a median survival time of 6 days. Administration of rhodamine 6G or casiopeina II-gly prolonged the survival of AS-30D-bearing rats (Fig. 3). These drugs were non-toxic for non-tumor-bearing animals, since they did not induce mortality at the doses assayed or at higher concentrations (100 μM casiopeina II-gly) (data not shown). To extend the animal survival time (data not shown), 1–2 extra-doses of each drug were administered on days 9 and 11; the effect of extra-dose administration after day 11 was not examined. Both drugs showed a further increase in the median survival time to 2 (rhod 6G) and 8 (casio II) days, respectively (Fig. 3A).

The tumor progression brought about a 20 and 25-fold increase in the ascites volume and the total cellular density, respectively, of untreated AS-30D-bearing rats (Fig. 3B). In turn, after day 7, both drugs diminished the ascites tumor volume and cellular density of AS-30D hepatoma by $58 \pm 10\%$ and $70 \pm 12\%$, respectively.

Discussion

Metabolic changes induced by the presence of different carbon sources

Proliferation of AS-30D and HeLa cells was higher in the presence of glucose and glutamine than in the presence of only one of these carbon sources. Glutamine utilization provides mitochondrial ATP (Table 1) and amines required for purine and pyrimidine synthesis, whereas glucose provides cytosolic ATP,

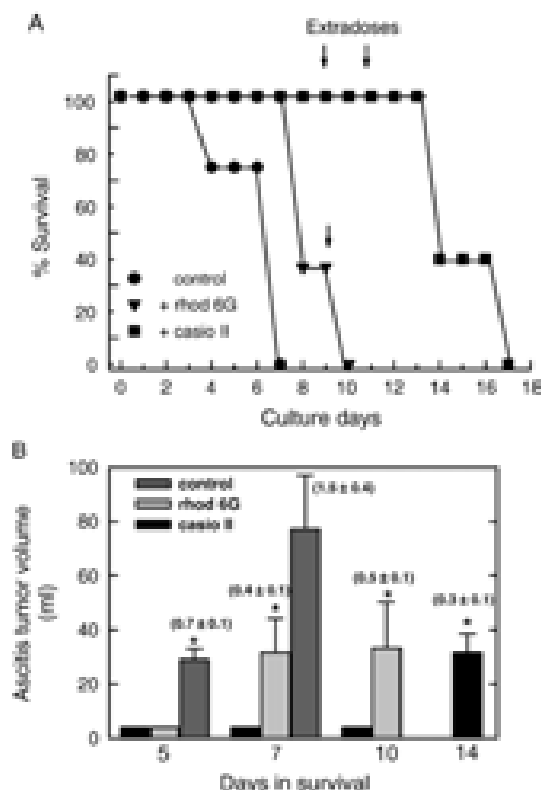


Fig. 3. (A) Survival of AS-30D hepatoma-bearing rats treated with rhodamine 6G or casiopeina II-gly. The drugs ($n = 7$ – 10 rats per set) were administered i.p. $30 \mu\text{g/kg}$ in days 0, 2, 4 and 6; arrows indicate the day when an extra dose was administered. (B) Effects of rhodamine 6G or casiopeina II-gly on the growth (ascitis tumor volume and total cellular density) of AS-30D hepatoma in rats ($n = 5$). The values shown between parentheses indicate the total cellular number grown ($\times 10^{10}$). * $P < 0.005$ vs. day 7 column without drugs ($n = 10$ rats).

reducing equivalents, and glycolytic intermediaries required for biosynthesis of amino acids, phospholipids and ribose phosphate. Differences in the proliferation rate of HeLa cells, grown in glucose or glutamine- and galactose-rich medium, have been previously described (Rossignol et al., 2004). In that study, the presence of glutamine resulted in an enhancement of respiratory rate (50%), cytochrome *c* oxidase activity (30%) and mitochondrial protein expression (respiratory chain complexes I–V and citrate synthase), suggesting that glutamine promoted the de novo biosynthesis of mitochondrial components (Rossignol et al., 2004).

In turn, AS-30D and HeLa cells grown in the presence of glutamine exhibited a significantly higher rate of OxPhos and higher cellular ATP content than cells grown with gln + gluc. When glucose was present, OxPhos of AS-30D and HeLa cells was partially inhibited (Crabtree effect) (Melo et al., 1998; Rodríguez-Enríquez et al., 2001), although most of the cellular ATP was still derived from mitochondria (cf. Table 2).

The severe diminution in the ATP concentration attained in the presence of glucose suggests (a) the inactivation of some ATP-dependent enzymes such as the cyclin-dependent kinases, which are involved in the progression from phase G_1 to phase S ($K_{\text{mATP}} = 1 \text{ mM}$) (Schwacha and Bell, 2001); (b) the active degradation of ATP to AMP, and hence the inhibition of P-

ribose-PP synthetase (Mazurek et al., 1997); and (c) a strong regulatory function of glycolysis on mitochondrial ATP production (Biswas et al., 1997).

Diminution of growth in HeLa cells and AS-30D hepatoma by oxidative metabolism inhibition

Data of the present work on growth, glycolysis, OxPhos and ATP levels suggest that AS-30D and HeLa tumor cells have an oxidative type of metabolism, which implies that mitochondria play a central role in supporting the proliferation process. Therefore, a strategy to diminish the proliferation of these tumor lines would be the use of drugs that specifically block oxidative metabolism. The addition of typical inhibitors of OxPhos, such as oligomycin or rotenone, at relatively low doses, abolished the tumor proliferation and viability of HeLa cells and AS-30D hepatoma (cf. Table 3). Although both drugs are potent inhibitors of OxPhos, rotenone more drastically diminished the proliferation rate of both tumor lines. This might be due to a much slower binding of oligomycin to the ATP synthase, in comparison to rotenone binding to the respiratory chain complex I; however, the lengthy incubation of cells with the inhibitors might invalidate this explanation. Alternatively, the respiratory complex I could exert a higher flux control on OxPhos than the ATP synthase in both cell types (Rodríguez-Enríquez et al., 2000), bringing about a higher sensitivity to rotenone. Moreover, it has been reported that, in the lymphoma cell line WP and in a human osteosarcoma-derived line 143 B, low doses of rotenone (0.1 and 0.5 – $1 \mu\text{M}$, respectively) arrest the cell cycle at G_2/M and affect the microtubule assembly, leading to apoptosis (Armstrong et al., 2001).

Thus, the results of the present work support the proposal that the inhibition of the OxPhos pathway may be a suitable strategy for growth diminution in tumor lines with a predominantly oxidative type of metabolism. The effect of typical inhibitors of OxPhos on HeLa cell growth has already been reported (Izyumov et al., 2004): these inhibitors combined with 2-deoxyglucose induce cell death. However, the effect of these drugs on OxPhos was evaluated in the absence of exogenous energy substrates (cf. Table 2); in addition, these typical inhibitors can also affect non-tumorigenic cells. Hence, it would be of higher clinical relevance to test drugs that do not alter the physiology of healthy host cells (Lampidis et al., 1983; Fearon et al., 1987). Thus, the most appropriate strategy would probably be the use of lipophilic cationic drugs such as rhodamines, which preferentially accumulate and retain for longer periods in tumor cells than in normal tissues (Davis et al., 1985), promoting inhibition of mitochondrial function.

Several drugs that affect mitochondrial metabolism (i.e., 3-BrPA, clofazimine, ceramide) or glycolysis (lonidamine, cyclophosphamide or clotrimazol) have been considered as potent antitumor drug candidates (Sri-Pathmanathan et al., 1994; Gudź et al., 1997; Vivi et al., 1997; Ko et al., 2001; Penso and Beitner, 2002; Schimmel et al., 2004). However, some of them have been used at very high concentration (up to 5 mM) and have inhibitory effects over other cellular processes (De Martino et al., 1987; Pulselli et al., 1996; Penso and

Beitner, 2002). In contrast, rhodamine 123 at low doses (1 and 10 $\mu\text{g/ml}$, i.e., 2.6 and 26 μM) diminishes the colony formation of human tumors such as CRL 1420 and MCF-7 cells by 80–100%; a higher concentration (130 μM) does not affect growth of normal fibroblasts (Lampidis et al., 1983).

The addition of the glycolytic inhibitors iodoacetate, arsenite or gossypol did not significantly disturb the proliferation of AS-30D and HeLa cells (cf. Table 2). These observations suggested that glycolysis was not essential for cell proliferation, as long as OxPhos remained active in the cells. Although it has been documented that gossypol inhibits mitochondrial succinate dehydrogenase in PC3 (prostate cancer cells) (Jiang et al., 2002), respiration of AS-30D hepatoma and HeLa cells was not altered by this drug. It has been reported that the IAA concentration used in the present study for AS-30D cells (100 μM) totally inhibits glycolysis in intrapulmonary arteries, Muller cells and human retinal epithelial cells (Leach et al., 2001; Winkler et al., 2003). However, IAA could inhibit other enzymes (cysteine proteases) (Choi et al., 1998) and cellular processes (microtubule assembly) at concentrations above 100 μM (Luduena et al., 1994).

The ATP supply is not the only cellular process affected by the addition of the glycolytic or oxidative drugs. Targeting mitochondria induces either apoptosis, necrosis or blockage of cellular progression at low inhibitor concentrations in leukemia cells, HL-60 cells and Jurkat cells (Linsinger et al., 1999; Li et al., 2003; Pelicano et al., 2003). Therefore, the use of this kind of compounds may be effective against tumor cells by virtue of their toxic effect at several cellular levels, not only affecting ATP availability. Interestingly, rhodamines and casiopeina II-gly, at low doses, proved to be potent antineoplastic agents abolishing in vitro proliferation of both tumor cell types without affecting viability and proliferation of a non-tumorigenic line (cf. Table 3). These observations suggest that rhodamine 123, rhodamine 6G and casiopeina II-gly might be employed as an alternative metabolic therapy.

Rhodamine 6G has already been used in other in vivo models such as Walker 256 carcinosarcoma (Fearon et al., 1987). However, the effect of rhodamine 6G was only effective after adding 3-mercaptopycolinic acid, in agreement with the observation that Walker 256 depends on both ATP-producing pathways (Fearon et al., 1987). Indeed, the concentrations of rhodamine 6G and casiopeina II-gly, used in the present study to diminish tumor growth in vivo, were much lower than those of the same (0.8 mg/kg) or other metabolic drugs (1–128 mg/kg) used in other studies (Gold, 1971; Fearon et al., 1987; Sri-Pathmanathan et al., 1994; Weisberg et al., 1996). Rhodamine 6G and casiopeina II were not fully effective in preventing the hepatoma growth in animals. Thus, further studies with higher drug concentrations and with glycolytic drugs in combination with the oxidative drugs have to be carried out. Each type of cancer has different DNA mutations and perturbations of the intermediary metabolism; however, the ATP supply continues to depend solely on glycolysis and OxPhos. In the present study, we demonstrated in an in vivo model (cf. Figs. 3A, B) that low (micromolar) doses of only one drug, that affects the prevalent energy metabolism in rodent and human tumor lines, sufficed to

delay and reduce the tumor growth. Furthermore, these results suggest that selective inhibition of prevalent tumor energy metabolism through metabolic therapy is a potential novel approach to cancer treatment.

The changes in tumor energy metabolism have been already applied to diagnose and monitor cancer through PET (positron emission tomography) or a combination of PET with computed tomography of a glucose derivative (Seemann, 2004). By assuming that tumor cells have a higher glucose utilization (and hence higher glucose uptake) than normal cells, it has been possible to localize a variety of primary tumors and metastases (Patronas et al., 1985; Wagner, 1993; Schiepers and Hoh, 1998) although, unfortunately, the PET technique has been unsuccessful in detecting others (Lassen et al., 1999). Perhaps the assumption that cancer cells exhibit higher glucose utilization does not apply to all tumor cell lines and, as shown in the present work, many tumor cells may have an oxidative type of metabolism. It follows that once the type of energy metabolism in a tumor cell line is established, it might be possible to apply PET with a probe directed towards mitochondria in those tumors which are presumably non-glycolytic but oxidative.

Moreover, acquired or inherent drug resistance in tumor cells, which is a recurrent problem in treatment therapies, seems closely related to the presence of partially uncoupled mitochondria that preferentially oxidize fatty acids and over-express uncoupling protein 2 (Harper et al., 2002). But lipophilic cation drugs such as rhodamines and casiopeinas might not be highly effective to kill this type of tumor cells, since the lower mitochondrial membrane potential would not preferentially accumulate cationic drugs. However, by understanding this particular tumor type of metabolism, it seems feasible to design drugs that specifically block mitochondrial fatty acid oxidation or uncoupling protein activity.

Acknowledgments

The present work was partially supported by grants SALUD-2002-C01-7677 and 43811-Q from CONACyT-México. The authors thank Lidia Barron for her expert technical assistance in the isolation of lymphocytes.

References

- Armstrong, J.S., Hornung, B., Lecane, P., Jones, D.P., Knox, S.J., 2001. Rotenone-induced G2/M cell cycle arrest apoptosis in a human B lymphoma cell line PW. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 973–978.
- Baggetto, L.G., 1992. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* 74, 959–974.
- Bergmeyer, H.U., 1983. Metabolites 1, carbohydrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim Verlag Chemie, Germany, p. 671.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E., 1974. Metabolites, carbohydrate metabolism. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, Orlando, FL, p. 174.
- Biswas, S., Ray, M., Misra, S., Dutta, D.P., Ray, S., 1997. Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic leucocytes by methylglyoxal. *Biochem. J.* 323, 343–348.
- Cariati, R., Zancai, P., Righetti, E., Rizzo, S., De Rossi, A., Boiocchi, M.I., Dolcetti, R., 2003. Inhibition of oxidative phosphorylation underlies the

- antiproliferative and proapoptotic effects of mofarotene (Ro 40-8757) in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 22, 906–918.
- Choi, M.H., Park, W.J., Park, Y.J., Chai, J.Y., Lee, S.H., 1998. Isolation and characterization of a 40 kDa cysteine protease from *Gymnophalloides seoi* adult worms. *Korean J. Parasitol.* 36, 133–141.
- Davis, S., Weiss, M.J., Wong, J.R., Lampidis, T.J., Chen, L.B., 1985. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 260, 13844–13850.
- De Martino, C., Malorni, W., Accinni, L., Rosati, F., Nista, A., Formisano, G., Silvestrini, B., Arancia, G., 1987. Cell membrane changes induced by lonidamine in human erythrocytes and T lymphocytes, and Ehrlich ascites tumor cells. *Exp. Mol. Pathol.* 46, 15–30.
- Dixon, H.B.F., 1997. The biochemical action of arsenic acids, especially as phosphate analogues. *Adv. Inorg. Chem.* 44, 191–227.
- Eigenbrodt, E., Fister, P., Reinacher, M., 1985. New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells. In: Reitner, R. (Ed.), *Regulation of Carbohydrate Metabolism*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 141–179.
- Fanciulli, M., Valentini, A., Bruno, T., Citro, G., Zupi, G., Floridi, A., 1996. Effect of the antitumor drug lonidamine on glucose metabolism of adriamycin-sensitive and -resistant human breast cancer cells. *Oncol. Res.* 8, 111–120.
- Fantin, V.R., Berardi, M.J., Scorrano, L., Korsmeyer, S.J., Leder, P., 2002. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell* 2, 29–42.
- Fearon, K.C.H., Plumb, J.A., Burns, H.J.G., Calman, K.C., 1987. Reduction of the growth rate of the Walker 256 tumor in rats by rhodamine 6 G together with hypoglycemia. *Cancer Res.* 47, 3684–3687.
- Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., 1998. Differential regulation and ATP requirement for Caspase-8 and Caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 18, 894–979.
- Fromenty, B., Letteron, P., Fisch, C., Berson, A., Deschamps, D., Pessayre, D., 1993. Evaluation of human blood lymphocytes as a model to study the effects of drugs on human mitochondria. Effects of low concentrations of amidarone on fatty acid oxidation, ATP levels and cell survival. *Biochem. Pharmacol.* 46, 421–432.
- Geschwind, J.F.H., Ko, Y.H., Torberson, M.S., Magee, C., Pedersen, P.L., 2002. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res.* 62, 3013–3909.
- Gold, J., 1971. Inhibition of Walker 256 intramuscular carcinoma in rats by administration of hydrazine sulfate. *Oncology* 25, 66–71.
- Gudz, T.I., Tserng, K.Y., Hoppel, C.L., 1997. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem.* 272, 24154–24160.
- Hagen, T., D'Amico, G., Quintero, M., Palacios-Callender, M., Hollis, V., Lam, F., Moncada, S., 2004. Inhibition of mitochondrial respiration by the anticancer agent 2-methoxyestradiol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 923–929.
- Harper, M.E., Antoniou, A., Villalobos-Menuet, E., Russo, A., Trauger, R., Vendemio, M., George, A., Bartholomew, R., Carlo, D., Shaikh, A., Kupperman, J., Newell, E.W., Beshpalov, I.A., Wallace, S.S., Liu, Y., Rogers, J.R., Gibbs, G.L., Leahy, J.L., Camley, R.E., Melamed, R., Newell, M.K., 2002. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J.* 16, 1550–1557.
- Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Sakai, T., Miyamoto, H., 1984. Rb^{+} influx in response to changes in energy generation: effect of the regulation of the ATP content of HeLa cells. *J. Cell Physiol.* 119, 273–282.
- Izyumov, D.S., Avetisyan, A.V., Pletjushkina, O.Y., Sakharov, D.V., Wirtz, K. W., Chernyak, B.V., Skulachev, V.P., 2004. "Wages of fear": transient threefold in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 141–147.
- Jaroszewski, J.W., Kaplan, O., Cohen, J.S., 1990. Action of gossypol and rhodamine 123 on wild type and multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cells: 31P nuclear magnetic resonance and toxicity studies. *Cancer Res.* 50, 6936–6943.
- Jiang, J., Ghosh, P.K., Kulp, S.K., Sugimoto, Y., Liu, S., Czekajewski, J., et al., 2002. Effects of gossypol on O_2 consumption and CO_2 production in prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 22, 1491–1496.
- Jing, X., Ueki, N., Cheng, J., Imanishi, H., Hada, T., 2002. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 874–882.
- Ko, Y.H., Pedersen, P.L., Geschwind, J.F., 2001. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett.* 173, 83–91.
- Lampidis, J.J., Bernal, S.D., Summerhayes, I.C., Chen, L.B., 1983. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vivo. *Cancer Res.* 43, 716–720.
- Lassen, U., Daugaard, G., Eigtved, A., Damgaard, K., Friberg, L., 1999. 18F-FDG whole body positron emission tomography (PET) in patients with unknown primary tumours (UPT). *Eur. J. Cancer* 35, 1076–1082.
- Leach, R.M., Hill, H.M., Snetkov, V.A., Robertson, T.P., Ward, J.T.P., 2001. Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport chain in hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the hypoxic sensor. *J. Physiol.* 536, 211–224.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., Robinson, J.P., 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* 278, 8516–8525.
- Linsinger, G., Wilhelm, S., Wagner, H., Hacker, G., 1999. Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal. *Mol. Cell Biol.* 19, 3299–3311.
- Luduena, R.F., Roach, M.C., Epstein, D.L., 1994. Interaction of ethacrynic acid with bovine brain tubulin. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1677–1681.
- Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Moreno-Sánchez, R., 2003. Toxic effect of copper-based antineoplastic drugs (casiopinas) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1979–1989.
- Mazurek, S., Boschek, C.B., Eigenbrodt, E., 1997. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 315–330.
- Medina, M.A., Sánchez-Jimenes, F., Márquez, F.J., Pérez-Rodríguez, J., Quesada, A.R., Nunez de Castro, I., 1988. Glutamine and glucose as energy substrates for Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem. Int.* 16, 339–347.
- Melo, R.F., Stevan, F.R., Campello, A.P., Carnieri, E.G.S., Martinelli-De Oliveira, M.B., 1998. Occurrence of the Crabtree effect in HeLa cells. *Cell Biochem. Funct.* 16, 99–105.
- Moreno-Sánchez, R., Bravo, C., Vázquez, C., Ayala, G., Silveira, L., Martínez-Lavín, M., 1999. Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. *Biochem. Pharmacol.* 57, 743–752.
- Nakashima, R.A., Paggi, M.G., Pedersen, P.L., 1984. Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cell. *Cancer Res.* 44, 5702–5706.
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A., Dang, C.V., 2000. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275, 21797–21800.
- Park, S.J., Wu, C.H., Gordon, J.D., Zhong, X., Emami, A., Safa, A.R., 2004. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 51057–51067.
- Patronas, N.J., Di Chiro, G., Kufta, C., Bairamian, D., Kornblith, P.L., Simon, R., Larson, S.M., 1985. Prediction of survival in glioma patients by means of positron emission tomography. *J. Neurosurg.* 62, 816–822.
- Pedersen, P.L., 1978. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor Res.* 22, 190–274.
- Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J.S., Hileman, E.O., Plunkett, W., Keating, M.J., Huang, P., 2003. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 37832–37839.
- Penso, J., Beitner, R., 2002. Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by clotrimazole and its correlation to cell viability and morphology. *Mol. Genet. Metab.* 76, 181–188.
- Poptani, H., Bansal, N., Jenkins, W.T., Blessington, D., Mancuso, A., Nelson, D. S., Feldman, M., Delikatny, E.J., Chance, B., Glickson, J.D., 2003. Cyclophosphamide treatment modifies tumor oxygenation and glycolytic

- rates of RIF-1 tumors: ^{13}C magnetic resonance spectroscopy, Eppendorf electrode, and redox scanning. *Cancer Res.* 63, 8813–8820.
- Pulselli, R., Amadio, L., Fanciulli, M., Floridi, A., 1996. Effect of lonidamine on the mitochondrial potential in situ in Ehrlich ascites tumor cells. *Anticancer Res.* 16, 419–423.
- Qian, S.Z., Wang, Z.G., 1984. Gossypol: a potential antifertility agent for males. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24, 329–360.
- Reitzer, L.J., Wice, B.M., Kenell, D., 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254, 2669–2676.
- Rodríguez-Enríquez, S., Torres-Márquez, M.E., Moreno-Sánchez, R., 2000. Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 21–30.
- Rodríguez-Enríquez, S., Juárez, O., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R., 2001. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.* 268, 2512–2519.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., Capaldi, R.A., 2004. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 64, 985–993.
- Schiepers, C., Hoh, C.K., 1998. Positron emission tomography as a diagnostic tool in oncology. *Eur. Radiol.* 8, 1481–1494.
- Schimmel, K.J., Richel, D.J., Van den Brink, R.B., Guchelaar, H.J., 2004. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat. Rev.* 30, 181–191.
- Schwacha, A., Bell, S.P., 2001. Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication. *Mol. Cell* 8, 1093–1104.
- Seemann, M.D., 2004. PET/CT: fundamental principles. *Eur. J. Med. Res.* 9, 241–246.
- Shim, H., Chun, Y., Lewis, B.C., Dang, C.V., 1997. A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1511–1516.
- Sri-Pathmanathan, R.M., Plumb, J.A., Fearon, K.C., 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, 900–905.
- Stahl, A., Frick, A., 1978. Enzymic micro-assay for blood glutamine. *Clin. Chem.* 24, 1730–1733.
- Storch, A., Kaftan, A., Burkhardt, K., Schwarz, J., 2000. 1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) is toxic to dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via impairment of cellular energy metabolism. *Brain Res.* 855, 67–75.
- Vivi, A., Tassin, M., Ben-Horin, H., Navon, G., Kaplan, O., 1997. Comparison of action of the anti-neoplastic drug lonidamine on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance studies. *Breast Cancer Res. Treat.* 43, 15–25.
- Wagner, H.N., 1993. Oncology: a new engine for PET/SPECT. *J. Nucl. Med.* 34, 13N–29N.
- Weisberg, E.L., Koya, K., Modica-Napolitano, J., Li, Y., Chen, L.B., 1996. In vivo administration of MKT-077 causes partial yet reversible impairment of mitochondrial function. *Cancer Res.* 56, 551–555.
- Winkler, B.S., Sauer, M.W., Starnes, C.A., 2003. Modulation of the Pasteur effect in retinal cells: implication for understanding compensatory metabolic mechanism. *Exp. Eye Res.* 76, 715–723.
- Wu, G., Greene, L.W., 1992. Glutamine and glucose metabolism in bovine blood lymphocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B* 103, 821–825.
- Zu, X.L., Guppy, M., 2004. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 459–464.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aldridge, D. C., & Turner, W. B. (1969). The identity of zygosporin A and cytochalasin D. *J Antibiot*, 22(4); 170.
2. Aloj, L., Caracó, C., Jagoda, E., Eckelman, W. C., & Neumann, R. D. (1999). GLUT-1 and hexokinase expression: relationship with 2-fluoro-2deoxy-D-glucose uptake in A431 and T47D cells in culture. *Cancer Res*, 59; 4709-4714.
3. Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*, 67;199-225.
4. Armoni, M., Quon, M. J., Maor, G., Avigad, S., Shapiro, D. N., Harel, C., et al. (2002). PAX3/forkhead homolog in rhabdomyosarcoma oncoprotein activates glucose transporter 4 gene expression in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(11); 5312-5324.
5. Asano, T., Katagiri, H., Takata, K., Lin, J. L., Ishihara, H., Inukai, K., et al. (1991). The role ofn-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem*, 266; 24632–24636.
6. Axelrod, J. D., & Pilch, P. F. (1983). Unique cytochalasin B binding characteristics of the hepatic glucose carrier. *Biochemistry*, 22(9); 2222-2227.
7. Bagdade, J. D., Bierman, E. L., & Porte, D. J. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest*, 4610; 1549-1557.
8. Baggetto, L. G. (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie*, 74; 959-974.
9. Bell, G. I., Burant, C. F., Takeda, J., & Gould, G. W. (1993). Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem*, 26(268); 19161-19164.
10. Bergmeyer, H. U. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis* . New York: Academic Press.

11. Bergmeyer, H. U. (1983). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press.
12. Berry, G. T., Prantner, J. E., States, B., & Yandrasitz, J. R. (1994). The effect of glucose and galactose toxicity on myo-inositol transport and metabolism in human skin fibroblasts in culture. *Pediatr Res*, 35(2);141-147.
13. Bustamante, E., & Pedersen, P. L. (1977). High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(9); 3735-3739.
14. Christopher, C. W., Kohlbacher, M. S., & Amos, H. (1976). Transport of sugars in chick-embryo fibroblast. *Biochem J*, 158; 439-450.
15. Cohen, N. R., Knecht, D. A., & Lodish, H. F. (1996). Functional expression of rat GLUT 1 glucose transporter in Dictyostelium discoideum. *Biochem J*, 315; 971-975.
16. Colville, C. A., Seatter, M. J., Jess, T. J., Gould, G. W., & Thomas, H. M. (1993). Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in Xenopus oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem J*, 290; 701.
17. Cornish-Bowden, A. (1974). A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J*, 137(1); 143-144.
18. Cortés, S., Gromova, M., Evrard, A., Roby, C., Heyraud, A., Rolin, D. B., et al. (2003). In plants, 3-o-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol*, 131(2); 824-837.
19. Cseh, R., & Benz, R. (1999). Interaction of phloretin with lipid monolayers: relationship between structural changes and dipole potential change. *Biophys J*, 77(3); 1477-1488.
20. Cunningham, P., Afzal-Ahmed, I., & Naftalin, R. J. (2006). Docking studies show that D-glucose and quercetin slide through the transporter GLUT1. *J Biol Chem*, 281(9); 5797-803.

21. Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*, 55(1); 170-171.
22. Elbing, K., Larsson, C., Bill, R. M., Albers, E., & Snoep, J. L. (2004). Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 70(9); 5323-2330.
23. Fell, D. (1997). *Understanding the Control of Metabolism*. London: Portland Press.
24. Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A., Prenzel, N., Ullrich, A. (2004). Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 24(12); 5172-5183.
25. Fung, K. P., Choy, Y. M., Chan, T. W., Lam, W. P., & Lee, C. Y. (1986). Glucose regulates its own transport in Erlich ascites tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 134(3); 1231-1237.
26. Gould, G. W., & Holman, G. D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J*, 295; 329-341.
27. Gould, G. W., Thomas, H. M., Thomas, J. J., & Bell, G. I. (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver and brain isoforms. *Biochem*, 30; 5139-5145.
28. Griffin, J. F., Rampal, A. L., & Jung, C. Y. (1982). Inhibition of glucose transport in human erythrocytes by cytochalasins: A model based on diffraction studies. *Proc Natl Acad Sci*, 79; 3759-3763.
29. Griguer, C. E., Oliva, C. R., & Gillespie, G. Y. (2005). Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. *J Neurooncol*, 74(2); 123-133.
30. Haidle, A. M., & Myers, A. G. (2004). An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(33); 12048-12053.

31. Han, X., Wei, H., Wang, Y., Luo, C. (1996). Inhibitory effects of gypenoside on rat heart and brain Na⁺, K⁺(-)-ATPase activity. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 21(5); 299-302, 320.
32. Hughes, S. D., Johnson, J. H., Quaade, C., & Newgard, C. B. (1992). Engineering of glucose-stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(2); 688-692.
33. Iliopoulos, O., Levy, A. P., Jiang, C., Kaelin, W. G., & Goldberg, M. A. (1996). Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci*, 93; 10595-10599.
34. Joost, H., & Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators, nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Mem Biol*, 18; 247-256.
35. Kasahara, T., & Kasahara, M. (1996). Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 315; 177-182.
36. Kashiwaya, Y. K., Sato, K., Tsuchiya, N., Thomas, S., Fell, D. A., Veech, R. L., et al. (1994). Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *J Biol Chem*, 269; 25502–25514.
37. Kato, H., Takita, J., Miyazaki, T., Nakajima, M., Fukai, Y., Masuda, N., et al. (2003). Correlation of 18-F-fluorodeoxyglucose (FDG) accumulation with glucose transporter (Glut-1) expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 23(4); 3263-3272.
38. Kim, Y. S. (2002). Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *J Biochem Mol Biol*, 35(5); 443-451.
39. Kletzien, R. F., Perdue, J. F., & Springer, A. (1972). Cytochalasin A and B. Inhibition of sugar uptake in cultured cells. *J Biol Chem*, 247(9); 2964-2966.

40. Knaack, D., Fiore, D. M., Surana, M., Leiser, M., Laurance, M., Hegre, O. D., et al. (1994). Clonal insulinoma cell line that stably maintains correct glucose responsiveness. *Diabetes*, 43(12); 1413-1417.
41. Koh, D. S., Reid, G., & Vogel, W. (1994). Activating effect of the flavonoid phloretin on Ca(2+)-activated K⁺ channels in myelinated nerve fibers of *Xenopus laevis* [corrected]. *Neurosci Lett*, 165(1-2); 167-170.
42. LeFevre, P. G., & Marshall, J. K. (1959). The attachment of phloretin and analogues to human erythrocytes in connection with inhibition of sugar transport. *J Biol Chem*, 234; 3022-3026.
43. Levitsky, L. L., Zheng, Q., Mink, K., & Rhoads, D. B. (1994). GLUT-1 and GLUT-2 mRNA, protein, and glucose transporter activity in cultured fetal and adult hepatocytes. *Am J Physiol*, 267; 88-94.
44. Li, H., Schopfer, L. M., Nachon, F., Froment, M. T., Masson, P., & Lockridge, O. (2007). Aging pathways for organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase, including novel pathways for isomalathion, resolved by mass spectrometry. *Toxicol Sci*, 100(1); 136-145.
45. Lin, S., Lin, D. C., & Flanagan, M. D. (1978). Specificity of the effects of cytochalasin B on transport and motile processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(1); 329-333.
46. López-Gómez, F. J., Torres-Márquez, M. E., & Moreno-Sánchez, R. (1993). Control of oxidative phosphorylation in AS-30D hepatoma mitochondria. *Int J Biochem*, 25(3); 373-377.
47. Macheda, M. L., Rogers, S., & Best, J. D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*, 202; 654-662.
48. Mahraoui, L., Rousset, M., Dussaulx, E., Darmoul, D., Zweibaum, A., & Brot-Laroche, E. (1992). Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *Am J Physiol*, 263; G312-8.
49. Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Macías-Silva, M., Sosa-Garrocho, M., et al. (2006). Determining and understanding the control of glycolysis in fast-

- growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J*, 273(9); 1975-88.
50. Medina, R. A., & Owen, G. I. (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res*, 35(1); 9-26.
 51. Medina, R. A., Meneses, A. M., Vera, J. C., Gúzman, C., Nualart, F., Rodriguez, F., et al. (2004). Differential regulation of glucose transporter expression by estrogen and progesterone in Ishikawa endometrial cancer cells. *J Endocrinol*, 182(3); 467-478.
 52. Mendoza-Cózatl, D. G., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys Acta*, 1706(1-2); 88-97.
 53. Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., & Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*, 274(6); 1393-1418.
 54. Moreno-Sanchez, R., Saavedra, E., Mendoza-Cozatl, D., & Rodríguez-Enríquez, S. (2005). El análisis de control de flujo como herramienta en la manipulación de vías metabólicas. En O. Flores-Herrera, E. Rendón-Huerta, H. Riveros-Rosas, A. Sosa-Peinado, E. Vázquez-Contreras, & I. Velázquez-López, *Mensaje Bioquímico, Vol. XXIX* (págs. 181-223). Cd Universitaria, México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
 55. Nagamatsu, S., Nakamichi, Y., Inoue, M., Nishino, H., & Sawa, H. (1996). Rat C6 glioma cell growth is related to glucose transport and metabolism. *Biochem J*, 319(15); 477-482.
 56. Nakashima, R. A., Paggi, M. G., Scott, L. J., & Pedersen, P. L. (1988). Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. *Cancer Res*, 48(4); 913-919.
 57. Nishimura, H., Pallardo, F. V., Seidner, G. A., Vannucci, S., Simpson, I. A., & Birnbaum, M. J. (1993). Kinetics of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 268(12); 8514-8520.

58. Nishioka, T., Oda, Y., Seino, Y., Yamamoto, T., Inagaki, N., Yano, H., et al. (1992). Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. *Cancer Res*, 14(52); 3972-3279.
59. Owen, J. D. (1974). The effect of phloretin on the potassium conductance in *Aplysia* giant neurons. *J Membr Biol*, 16(1); 65-78.
60. Parry, D. M., & Pedersen, P. L. (1983). Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. Evidence for an outer mitochondrial membrane location. *J Biol Chem*, 258(18); 10904-10912.
61. Pastakia, K.B., & Dwyer, D. M. (1987). Identification and characterization of a ribose transport system in *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, 26 (1-2); 175-181.
62. Rodríguez-Enríquez, S., Juárez, O., Rodríguez-Zavala, J. S., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur J Biochem*, 268(8); 2512-2519.
63. Rodríguez-Enríquez, S., Torres-Márquez, M. E., & Moreno-Sánchez, R. (2000). Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 375(1); 21-30.
64. Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Marín-Hernández, A., Ruiz-Azuara, L., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 215(2); 208-217.
65. Rudlowski, C., Becker, A. J., Schroder, W., Rath, W., Buttner, R., & Moser, M. (2003). GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*, 120(5); 691-698.
66. Rutter, W. J., & Brosemer, R. W. (1961). Glucose production by isolated rat liver cells. An amylase-oligoglucosidase pathway for glycogen breakdown. *J Biol Chem*, 236;1247-1252.

67. Rzymowska, J. (1994). The effect of low temperature on the enzyme activities and the level of SH groups in benign gastric ulcer and gastric carcinoma. *J Pharm Pharmacol*, 46(6); 517-518.
68. Sakashita, M., Aoyama, N., Minami, R., Maekawa, S., Kuroda, K., Shirasaka, D., et al. (2001). Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features. *Eur J Cancer*, 2(37); 204-209.
69. Salas-Burgos, A., Iserovich, P., Zuniga, F., & Vera, J. C. (2004). Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter GluT 1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys J*, 87; 2990-2999.
70. Sánchez-Martínez, C., & Aragón, J. J. (1997). Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland. *FEBS Lett*, 409(1); 86-90.
71. Sarabia, V., Lam, L., Burdett, E., Leiter, L. A., & Klip, A. (1992). Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. *J Clin Invest*, 90; 1386-1395.
72. Scarborough, G. A. (1970). Sugar transport in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, 245(7); 1694-1698.
73. Scarborough, G. A. (1970). Sugar transport in *Neurospora crassa*. A second glucose transport system. *J Biol Chem*, 245(15); 3985-3987.
74. Schlamowitz, M., Shaw, A., & Jackson, W. T. (1969). Limitations of the Dixon plot for ascertaining nature of enzyme inhibition. *Tex Rep Biol Med*, 27(2); 483-488.
75. Segel, I. H., & Fisher, J. R. (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: BioScience.
76. Seyfang, A., & Duszenko, M. (1991). Specificity of glucose transport in *Trypanosoma brucei*, effective inhibition by phloretin and cytochalasin B. *Eur J Biochem*, 202; 191-196.

77. Shakespeare, V., & Buchanan, J. H. (1978). Studies on phosphoglucose isomerase from cultured human fibroblasts: absence of detectable ageing effects on the enzyme. *J Cell Physiol*, 94(1);105-15.
78. Shibata, K., Kajiyama, H., Ino, K., Nawa, A., Nomura, S., Mizutani, S., et al. (2007). P-LAP/IRAP-induced cell proliferation and glucose uptake in endometrial carcinoma cells via insulin receptor signaling. *BMC Cancer*, 19(7); 15.
79. Stacey, S. N., Bartholomew, J. S., Ghosh, A., Stern, P. L., Mackett, M., & Arrand, J. R. (1992). Expression of human papillomavirus type 16 E6 protein by recombinant baculovirus and use for detection of anti-E6 antibodies in human sera. *J Gen Virol*, 73; 2337-2345.
80. Stein, W. D. (1986). Intrinsic, apparent, and effective affinities of co- and countertransport systems. *Am J Physiol*, 250; 523-33.
81. Sultzman, L. A., & Carruthers, A. (1999). Stop-flow analysis of cooperative interactions between GLUT1 sugar import and export sites. *Biochem*, 38; 6640-6650.
82. Tateishi, U., Yamaguchi, U., Seki, K., Terauchi, T., Arai, Y., & Hasegawa, T. (2006). Glut-1 expression and enhanced glucose metabolism are associated with tumour grade in bone and soft tissue sarcomas: a prospective evaluation by [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33(6); 683-91.
83. Toon, M. R., & Solomon, A. K. (1987). Modulation of water and urea transport in human red cells: effects of pH and phloretin. *J Membr Biol*, 99(3); 157-164.
84. Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S. D., LaCasse, E., Korneluk, R. G., et al. (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 264(3); 781-788.
85. Tsukamoto, H., Mishima, H., Hirata, K., Sato, E., Kurokawa, T., & Ishibashi, S. (1997). Differences in the expression of glucose transporter

- protein isoforms in human retinoblastoma cell lines. *Jpn J Ophthalmol*, 41(4); 226-230.
86. Udagawa, T., Yuan, J., Panigrahy, D., Chang, Y. H., Shah, J., & D'Amato, R. J. (2000). Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(2); 421-427.
 87. Valenzuela-Soto, E. M., & Muñoz-Clares, R. A. (1993). Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso Ordered Bi Bi steady state mechanism. *J Biol Chem*, 268(32); 23818-23823.
 88. Waki, A., Kato, H., Yano, R., Sadato, N., Yokoyama, A., Ishii, Y., et al. (1998). The importance of glucose transport activity as the rate-limiting step of 2-deoxyglucose uptake in tumor cells in vitro. *Nucl Med Biol*, 25; 593-597.
 89. Watson, R. T., Kanzaki, M., & Pessin, J. E. (2004). Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev*, 25(2); 177-204.
 90. Weiss, J. N. (1997). The Hill equation revisited: uses and misuse. *FASEB J*, 11(11); 835-841.
 91. Wheeler, T. J., & Hinkle, P. C. (1981). Kinetic properties of the reconstituted glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem*, 256(17); 8907-8914.
 92. Whitesell, R. R., Ardehali, H., Printz, R. L., Beechem, J. M., Knobel, S. M., Piston, D. W., et al. (2003). Control of glucose phosphorylation in L6 myotubes by compartmentalization, hexokinase, and glucose transport. *Biochem J*, 370; 47-56.
 93. Wilson, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*, 206; 2049–2057.
 94. Wood, I., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Brit J Nut*, 89; 3-9.

- 95.**Younes, M., Ertan, A., Lechago, L. V., Somoano, J., & Lechago, J. (1997). Human erythrocyte glucose transporter (Glut1) is immunohistochemically detected as a late event during malignant progression in Barrett's metaplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6(5); 303-305.
- 96.**Younes, M., Lechago, L. V., Somoano, J. R., Mosharaf, M., & Lechago, J. (1997). Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res*, 17; 2747-2750.
- 97.**Zamora-León, S. P., Golde, D. W., Concha, I. I., Rivas, C. I., Delgado-López, F., Baselga, J., et al. (1996). Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(5);1847-1852.
- 98.**Zottola, R. J., Cloherty, E. K., Coderre, P. E., & Hansen, A. (1995). Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GluT 1 tetramerization. *Biochem*, 34(30); 9734-9747.
- 99.**Zu, X. L., & Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*, 313; 459-465.