



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA GLUCÓLISIS EN LAS CÉLULAS TUMORALES HUMANAS DE CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARISOL HERNÁNDEZ MUNDO



MÉXICO, D.F.

2009



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: Dr. José Pedraza Chaverri.

VOCAL: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares.

SECRETARIO: M. en C. Álvaro Marín Hernández.

1er. SUPLENTE: Profra. Perla Deyanira Maldonado.

2° SUPLENTE: Profra. Vanessa Maya Ampudia.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

ASESOR:

M. en C. Álvaro Marín Hernández.

SUSTENTANTE:

Marisol Hernández Mundo.

DEDICATORIAS

A Yavéh Dios

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, porque sé que todo lo que pueda llegar a ser siempre será gracias a Él.

A mi papá y a mi mamá

Por darme la vida y sembrar en mí el gusto por la superación profesional. Por su confianza y apoyo al permitirme estudiar una carrera profesional lejos de ustedes.

Mamá, gracias por tener siempre esas palabras que me llenaban de consuelo y valor cuando los problemas y cansancio me abrumaban.

Papá, gracias por nunca ponerme un límite en mis proyectos profesionales y por siempre protegerme.

Papá y mamá, gracias por todo su amor, consejos, sacrificios y por consentirme tanto. Este trabajo es para ustedes, porque sin su apoyo no hubiera podido llegar a esta etapa de mi vida. ¡LOS AMO!

A mis hermanos:

Abraham, por darme tu idea creativa en la realización de muchos trabajos, por ser el ejemplo de hermano mayor al apoyarme cuando lo he necesitado. Karina, por ser mi hermana chiquita y compartir conmigo momentos que solo contigo podría hacerlo. Boni, por ser mi hermanito genio chiquito y por regalarme siempre alegría y sonrisas.

A mis abuelitos Lorenzo (f) y Ma. Soledad (f)

Abuelito, lamentablemente no te conocí pero todo lo que me cuentan de ti es que fuiste un excelente abuelito. Sé que desde donde estás siempre me has estado guiando y apoyando.

Abuelita, por haber sido víctima del cáncer y haber sido mi motivo en la elección de este trabajo, sé que desde donde te encuentras siempre me estás dando tus bendiciones y que estarás orgullosa de mí, contando a todo el mundo los logros de tu nieta como siempre lo hacías, siento mucho no poder sentir tu cálido abrazo de felicitación, pero sé que ese día tan importante estarás conmigo festejando con esa alegría que siempre te caracterizó.

A mis abuelitos Matías y Celia

Por todas esas noches de desvelos y por todas esas tardes dedicadas a cuidarme. Por siempre contemplarme en sus bendiciones, por todo su apoyo y por todo su cariño.

Abuelita, gracias por esas cenas tan deliciosas, por consentirme, por estar atenta a todo lo que me ocurre y por siempre hablarme con tanta dulzura y cariño.

Abuelito, gracias por todos esas excursiones en tu Jeep, por compartir conmigo tu capacidad de inventiva en mis tareas, por despertar en mí el espíritu científico, porque sé, que si hubieras tenido la oportunidad serías un gran científico.

A mi tío José Luis (f) y a mi tía Ma. Cruz

Por ser los padres que encontré en mi llegada al DF, por brindarme el calor de una familia y por contribuir en la realización de mi carrera profesional. Gracias por darme la confianza de sentirme como una hija más en su casa. Gracias por todo su apoyo y cariño.

Tío, lamentablemente, ya no estás físicamente con nosotros pero tengo la convicción de que también estarás festejando conmigo.

A mi tío Carlos y a mi tía Alicia

Por ser unos padres más en el DF y contribuir en mi desarrollo profesional. Por su protección y cariño.

Gracias por siempre estar pendiente de mí como si fuera otra hija suya, por sus sabios consejos, por el apoyo que siempre me brindan para todo y que me ayuda a no sentirme sola.

A mis tíos: Francisco, Hermelindo, Víctor, Arnulfo, Félix, Pedro y Maruquita

Por todo su cariño y apoyo. Por inculcar en mí los valores de sencillez y fortaleza.

A mis tíos: Benito y Alfredo

Por ser un gran ejemplo a seguir debido a todos sus reconocimientos profesionales y desarrollo académico, que me motivan a continuar superándome.

Tío Benito, gracias por todo el apoyo que desde pequeña hasta la fecha me has brindado como un padre a sus hijos y que me ha ayudado a concluir mi carrera profesional.

A mi tía Yadi y a mi tía Lore

Por todo su cariño y apoyo. Gracias por esas tardes dedicadas al cuidado de mí y de mis hermanos, en los recuerdos de mi infancia siempre las tengo presentes. Tía Yadi, gracias por esos postres tan deliciosos que nos preparabas. Tía Lore, gracias por iniciar mi formación académica al enseñarme a escribir y a leer.

A mi tía Guillermina

Gracias por todo el apoyo y protección que me brindaste sin importar arriesgarte, lo que contribuyó a que continuara con mi carrera.

A mis tíos: Agustín y Humbertina

A ella por no darse por vencida y por continuar luchando contra el cáncer de mama. Por motivarme en la realización de este trabajo, esperando contribuir en la lucha contra esta enfermedad. Y a él por su apoyo y cariño hacia ella.

A todos mis primos

Claudia, Nancy, Anibal, Dave, Pamshus, Charly, Fiorella, Heber, Josué, Pablis, Mayra, Zaim y Gutu, por escucharnos y apoyarnos siempre uno al otro, por de niños compartir juegos y ahora de grandes compartir fiestas.

A César (Cesítar)

Por ser el novio que siempre busqué, por todos los sueños que juntos compartimos y que algún día haremos realidad. Gracias por todo tu amor, motivación y apoyo.

A mis mejores amigas

Eira, Brenda y Kari, por todos los gratos y amargos recuerdos que compartimos, por todo el apoyo que siempre me brindaron, por siempre poder confiar y contar con ustedes, ¡son las mejores!

A todas las mujeres víctimas del cáncer de mama.

AGRADECIMIENTOS

*A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** y, en especial, a la **Facultad de Química** por permitirme ser parte de ellas y por brindarme una formación profesional completa, con ética y calidad.*

*Al **Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”** por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.*

*Al **M. en C. Álvaro Marín Hernández** porque sin su asesoría no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Por compartir conmigo sus conocimientos, por su apoyo y paciencia.*

ÍNDICE

| | Pag. |
|---|------|
| Resumen..... | 1 |
| Capítulo 1: Marco teórico..... | 2 |
| 1.1 Definición y características del cáncer..... | 2 |
| 1.2 La glucólisis..... | 4 |
| 1.3 La glucólisis en las células tumorales..... | 6 |
| 1.3.1 Causas del incremento en la velocidad de la glucólisis en las células tumorales..... | 6 |
| 1.3.2 Isoformas de las enzimas glucolíticas en células tumorales..... | 9 |
| 1.3.3 Enzimas que controlan el flujo de la glucólisis en las células normales y en las células tumorales..... | 11 |
| 1.3.4 Procesos que se favorecen con el incremento en la glucólisis..... | 14 |
| 1.4 Terapias contra el cáncer..... | 18 |
| 1.5 El cáncer en México..... | 22 |
| Capítulo 2..... | 23 |
| 2.1 Planteamiento del problema..... | 23 |
| 2.2 Hipótesis..... | 24 |
| 2.3 Objetivo General..... | 24 |
| 2.4 Objetivos particulares..... | 24 |

| | |
|--|----|
| Capítulo 3: Materiales y métodos..... | 25 |
| 3.1 Líneas tumorales..... | 25 |
| 3.2 Cuantificación de la F-2,6-BP..... | 27 |
| 3.2.1 Purificación de la PPI-PFK..... | 28 |
| 3.2.2 Preparación de extractos básicos para cuantificar la F-2,6-PB..... | 29 |
| 3.2.3 Cuantificación de la F-2,6-BP en los extractos básicos..... | 29 |
| 3.3 Preparación de extractos citosólicos..... | 30 |
| 3.3.1 Medición de la actividad de la HK..... | 31 |
| 3.3.2 Medición de la actividad de la PFK-1..... | 32 |
| 3.3.3 Medición de flujos de la primera sección de la glucólisis..... | 33 |
| 3.4 Preparación de extractos ácidos..... | 34 |
| 3.4.1 Cuantificación de la G6P, de la F6P y del ATP..... | 35 |
| 3.4.2 Cuantificación del lactato..... | 36 |
| Capítulo 4: Resultados y discusión..... | 37 |
| 4.1 Determinación de la F-2,6-BP..... | 37 |
| 4.1.1 Purificación de la PPI-PFK..... | 37 |
| 4.1.2 Extracción de la F-2,6-BP..... | 41 |
| 4.1.3 Cuantificación de la F-2,6-BP..... | 42 |
| 4.2 Actividades de la HK y de la PFK-1..... | 45 |
| 4.3 Determinación de los flujos..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.4 Intermediarios de la glucólisis..... | 49 |
| 4.5 Glucólisis..... | 50 |
| Capítulo 5: Conclusiones..... | 52 |
| Capítulo 6: Perspectivas..... | 53 |
| Capítulo 7: Apéndice..... | 54 |
| 7.1 Columna de intercambio iónico..... | 54 |
| 7.1.1 Lavado de la columna de intercambio iónico..... | 54 |
| 7.2 Cuantificación de proteína..... | 54 |
| 7.2.1 Método de Biuret..... | 54 |
| 7.2.2 Método de Lowry..... | 55 |
| Capítulo 8: Referencias bibliográficas..... | 56 |

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

ALD: Aldolasa

ALD-A: Isoenzima A de la aldolasa

AMP: Adenosín monofosfato

ATP: Adenosín trifosfato

DAPI: Tinción fluorescente con el colorante DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol-9 que detecta el DNA de los micoplasmas.

DDDO: Dominio para la degradación dependiente de oxígeno del HIF-1 α

DHAP: Dihidroxi-acetona fosfato

DOC: Desoxicolato de sodio

DTT: Ditioneitol

ECM: Matriz extracelular

EDTA: Ácido etilén-diamino-tetra-acético

EGTA: Ácido etilén-glicol-tetra-acético

ENO: Enolasa.

ENO-1: Isoenzima 1 de la enolasa

F-1,6-BP: Fructosa-1,6-bisfosfato

F-2,6-BP: Fructosa-2,6-bisfosfato

F6P: Fructosa 6 fosfato

G3P: Gliceraldehído 3 fosfato

GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

α -GDH: α -glicerol fosfato deshidrogenasa

GLUT: Transportador de glucosa

G6P: Glucosa 6 fosfato

G6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

HEPES: Ácido 4-(2 hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico

HIF-1: Factor de transcripción inducido por la hipoxia

HIF-1 α : Subunidad alfa del factor de transcripción inducido por la hipoxia

HIF-1 β : Subunidad beta del factor de transcripción inducido por la hipoxia

HK: Hexocinasa

HPI: Hexosa fosfato isomerasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

LDH-A: Isoenzima A de la lactato deshidrogenasa

MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfónico

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)

NADP⁺: Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (forma oxidada)

NADPH: Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (forma reducida)

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

No. ATCC: Número de clasificación asignado a las líneas celulares por la compañía proveedora ATCC.

No. DSMZ: Número de clasificación asignado a las líneas celulares por la compañía proveedora DSMZ (por su nombre en alemán Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

PEP: Fosfoenolpiruvato

PET: Tomografía por emisión de positrones

PFK-1: Fosfofructocinasa tipo 1

PFK-1 L: Isoenzima L de la fosfofructocinasa tipo 1

PFK-2: Fosfofructocinasa tipo 2

PFKFB-3: Isoenzima 3 de la fosfofructocinasa tipo 2

2PG: 2-fosfoglicerato

3PG: 3-fosfoglicerato

PGK: Fosfoglicerato cinasa

PGK 1: Fosfoglicerato cinasa tipo 1

PGM: Fosfoglicerato mutasa

PHD: Prolil hidroxilasas

PK: Piruvato cinasa

PK-L: Isoenzima L de la piruvato cinasa

PK-M: Isoenzima M de la piruvato cinasa

PMSF: Fluoruro fenilmetanosulfonil

PPi-PFK: Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato

pVHL: Proteína Von Hippel-Lindau

Rbx1: Proteína Ring-box 1

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TIM: Triosa fosfato isomerasa

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

RESUMEN

Las células tumorales muestran una marcada modificación en el metabolismo energético en comparación con el tejido de origen; la más notoria alteración es un incremento en la capacidad glucolítica bajo aerobiosis. De acuerdo a estudios previos, se señalan como principales causas de este incremento glucolítico la sobreexpresión del factor de transcripción inducido por la hipoxia (HIF- 1) y los cambios en los mecanismos de regulación de la hexocinasa (HK) y de la fosfofructocinasa tipo I (PFK-1).

En este trabajo se caracterizó parcialmente la glucólisis en las células tumorales humanas de cáncer de mama MDA-MB 231, para lo cual se midieron las concentraciones intracelulares de G6P, F6P, ATP, F-2,6-BP así como el flujo glucolítico. También se determinaron las actividades de la HK, de la PFK-1 y los flujos de la primera sección de la glucólisis.

La concentración de F-2,6-BP se encontró notablemente incrementada en las células MDA-MB 231 (13 μ M). En esta línea tumoral se observó un incremento en la actividad máxima de la HK y PFK-1 (0.06 y 0.05 U/mg de proteína, respectivamente) con respecto a células normales. Las actividades máximas de ambas enzimas son muy similares. Sin embargo, el flujo a partir de la HK hasta la formación del α -glicerol-3-fosfato es el más bajo (0.005 U/mg de proteína), lo que nos indica que en MDA-MB 231 ésta es la enzima que puede ejercer el control sobre el flujo glucolítico. Por otra parte la PFK-1, debido a la concentración de F-2,6-BP (13 μ M) encontrada en las células MDA-MB 231, podría no ejercer un control significativo. Estos hallazgos indican que la HK contribuye importantemente en el control de la glucólisis en las células de cáncer de mama.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

El cáncer es una enfermedad padecida por la humanidad desde tiempos remotos, ya que se han encontrado evidencias de tumores malignos en momias egipcias. Setenta siglos después sigue sin ser comprendido en toda su totalidad. A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad; se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en 2007. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015. Como resultado de los adelantos de la medicina moderna las tasas de curación de esta enfermedad han ascendido. Sin embargo, la mortalidad por cáncer en el mundo sigue en aumento (*Organización Mundial de la Salud, 2008*).

1.1 Definición y características del cáncer

El cáncer es una alteración morfológica y funcional seguida de la proliferación descontrolada de las células de un tejido, que invaden, desplazan y destruyen, localmente y a distancia, otros tejidos sanos del organismo. Los procesos de crecimiento y división de las células normales están controlados. La excepción a esta norma la constituyen las células cancerosas, que han surgido como variantes y han perdido este control (Fig.1) (*Torroella y Villa, 1998*).

Las células tumorales presentan características propias que marcan una diferencia significativa con respecto a las células normales. Por ejemplo, presentan una diferenciación errónea de las células; son inmortales, es decir, tienen un crecimiento indefinido; pierden la inhibición por contacto y, como

consecuencia de ello, forman la masa tumoral ó neoplasia; se caracterizan por una proliferación celular descontrolada (pierden su dependencia a factores de crecimiento); presentan una “independencia a anclaje”, es decir, pierden la necesidad de sustentación y ganan capacidad de desplazamiento e incrementan la velocidad de glucólisis.

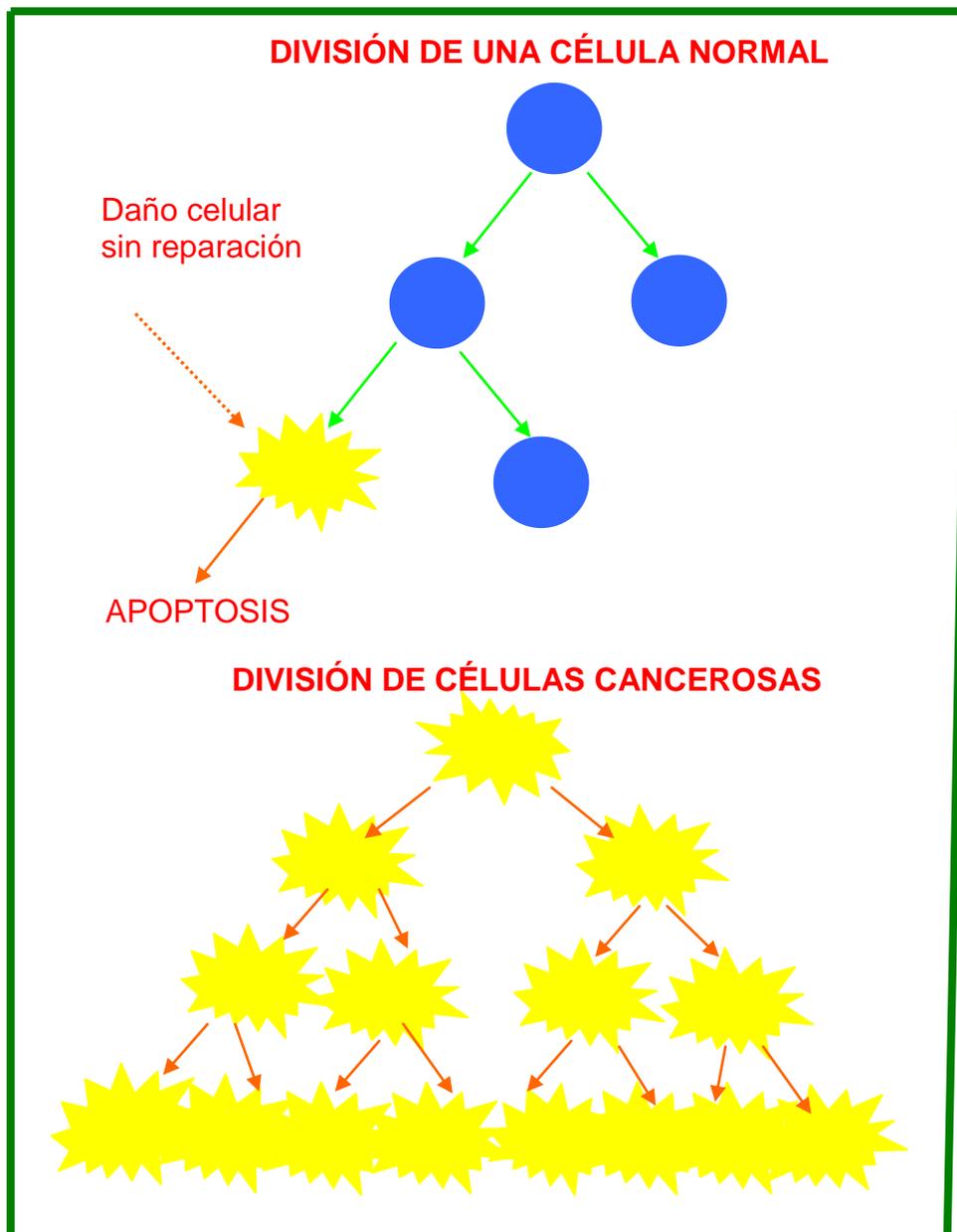


Figura 1. DIVISIÓN DE CÉLULAS NORMALES Y CÉLULAS CANCEROSAS. Se puede apreciar que en una célula normal el proceso de división y crecimiento está regulado por mecanismos de control; de esta forma, si existe daño celular sin reparación, se lleva a cabo la muerte celular programada o apoptosis. En cambio, en las células tumorales se ha perdido este control y como consecuencia, se dividen y crecen indefinidamente.

1.2. La glucólisis

La glucólisis (Fig.2) es la vía principal para la utilización de la glucosa y se lleva a cabo en el citosol de todas las células. Esta vía funciona en presencia (glucólisis aerobia) o en ausencia (glucólisis anaerobia) de oxígeno.

En la glucólisis anaerobia el NADH es reoxidado al acoplarse a la reducción del piruvato en lactato y el NAD^+ que resulta permite que prosiga la glucólisis ya que es requerido por la GAPDH para la oxidación del G3P (Fig. 2). En condiciones anaerobias la cantidad total de energía liberada, a partir de un mol de glucosa es de 2 moles de ATP y el producto final obtenido es el lactato (*Murray et al., 1997*).

El producto final de la glucólisis aerobia es el piruvato. El piruvato puede ser oxidado completamente a CO_2 y H_2O por enzimas situadas dentro de la mitocondria (Ciclo de Krebs). El proceso global de la glucólisis aerobia, más la oxidación mitocondrial posterior del piruvato a CO_2 y H_2O es capaz de producir 38 ATP.

Las enzimas que generalmente mantienen el control en la ruta glucolítica son la hexocinasa (HK) y la fosfofructocinasa (PFK-1) (*Devlin, 2004*), la HK es inhibida por su producto la glucosa 6 fosfato (G6P); la PFK-1 es inhibida por el citrato y el ATP. Así, por ejemplo, la HK y la PFK-1 en tejido normal (eritrocitos humanos, en células aisladas de corazón de rata y en músculo esquelético) controlan entre un 59% a 100% (*Rapoport et al., 1976; Kashiwaya et al., 1994*).

GLUCÓLISIS ANAEROBIA EN MAMIFEROS

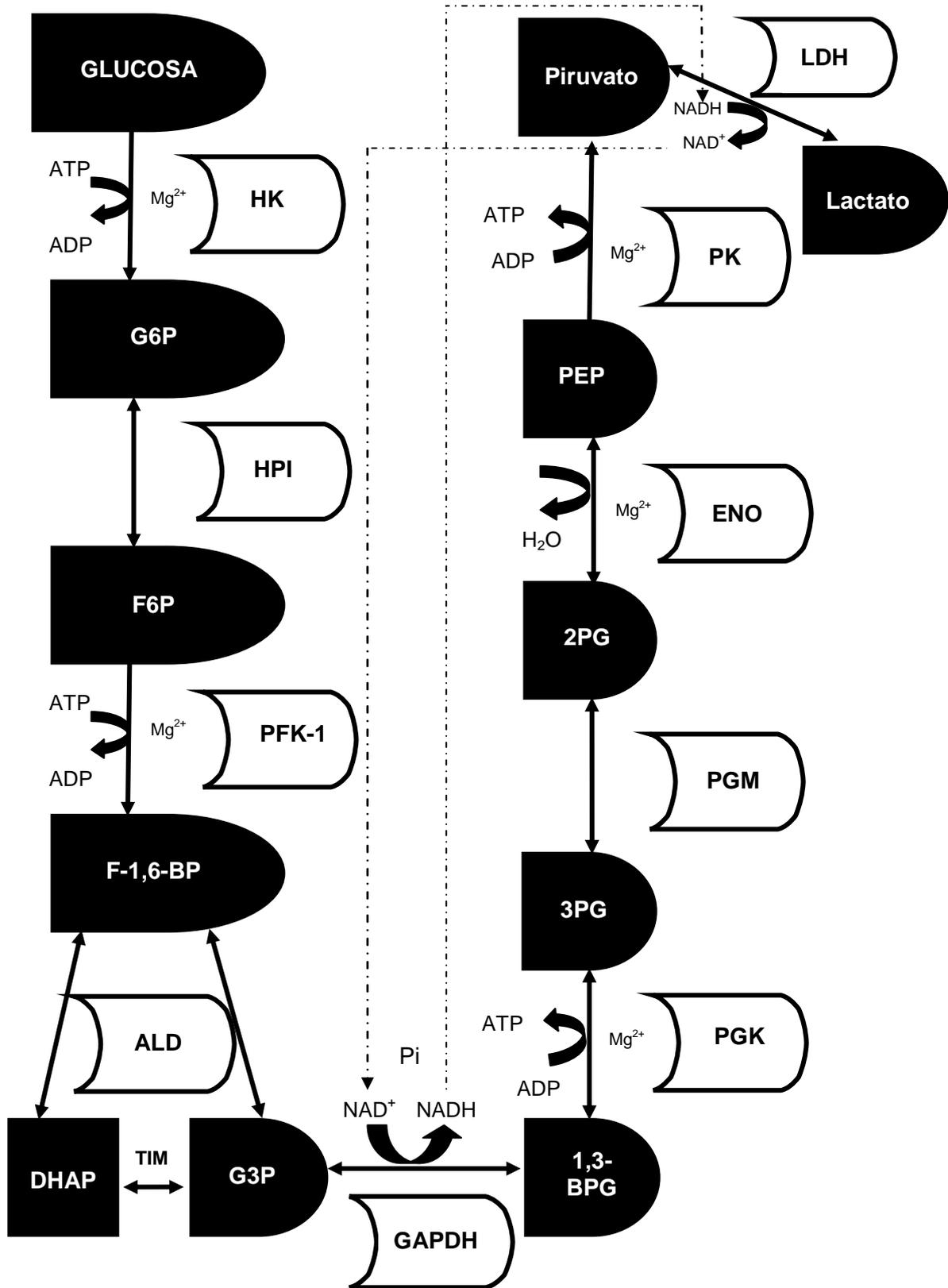


Figura 2. ENZIMAS E INTERMEDIARIOS DE LA GLUCÓLISIS.

HK, hexocinasa; G6P, glucosa 6 fosfato; HPI, hexosa fosfato isomerasa; F6P, fructosa 6 fosfato; PFK-1, fosfofructocinasa tipo 1; F-1,6-BP, fructosa 1,6 bifosfato; ALD, aldolasa; TIM, triosa fosfato isomerasa; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G3P, gliceraldehído 3 fosfato; GAPDH, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; 1,3-BPG, 1,3 bisfosfoglicerato; PGK, fosfoglicerato cinasa; 3PG, 3 fosfoglicerato; PGM, fosfoglicerato mutasa; 2PG, 2 fosfoglicerato; ENO, enolasa; PEP, fosfoenolpiruvato; PK, piruvato cinasa; LDH, lactato deshidrogenasa.

1.3 La glucólisis en las células tumorales

En las células de mamíferos, la glucólisis es inhibida por la presencia de oxígeno. Esta inhibición es denominada “*Efecto Pasteur*” (Racker, 1974). Las células tumorales muestran una marcada modificación en el metabolismo energético en comparación con el tejido de origen. La más notoria alteración es un incremento en la capacidad glucolítica bajo aerobiosis (pérdida del efecto Pasteur) con producción de ácido láctico (Aguirre y Sotelo, 2008; Moreno-Sánchez et al., 2007). La conversión de glucosa a ácido láctico en presencia de oxígeno es conocida como “*Efecto Warburg*” (Warburg, 1930).

1.3.1 Causas del incremento en la velocidad de glucólisis en las células tumorales

El Factor de transcripción inducido por la hipoxia 1 (HIF-1)

HIF-1 es un factor de transcripción constituido por 2 subunidades, HIF- α y HIF-1 β . Han sido descritas tres isoformas del HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α), de las cuales HIF-1 α y HIF-2 α son las mejor caracterizadas (Wiesener et al., 2003). La regulación y estabilidad del factor depende en su mayor parte de HIF-1 α , que en anaerobiosis es altamente estable (Semenza, 2000). Bajo condiciones aeróbicas, el HIF-1 α es hidroxilado en sus dos residuos de prolina (Pro402 y Pro564), ubicados dentro de su dominio de degradación dependiente de oxígeno (DDDO). Esta hidroxilación es catalizada por proliil-hidroxilasas específicas (PHD1, PHD2 y PHD3), que requieren de oxígeno, 2-oxoglutarato, ascorbato y Fe²⁺ (Jaakkola et al., 2001; Schofield y Ratcliffe, 2005). La hidroxilación permite el reconocimiento específico de su DDDO por la proteína von Hippel Lindau (pVHL) (Ohh et al., 2000), la cual forma un complejo con la

elongina B, la elongina C, la culina 2 y la proteína Rbx1, este complejo funciona como una E3 ubiquitina ligasa, que media la poliubiquitilación (proceso que “marca” a las proteínas para ser degradadas por el proteasoma) del HIF-1 α (Kondo y Kaelin, 2001). HIF-1 α poliubiquitilado, es reconocido y degradado por el proteasoma 26S (Maxwell et al., 1999). Por otra parte, si el HIF-1 α no es degradado, su actividad transcripcional es bloqueada cuando las asparaginil-aspartil hidroxilasas hidroxilan la asparagina 803, que se encuentra en el dominio de transactivación (C-TAD) (Fedele et al, 2002; Pouyssegur et al, 2006). Bajo condiciones hipóxicas (concentración de O₂ del 1% ó 12.5 μ M), la actividad de las hidroxilasas se inhibe, resultando en la estabilización del HIF-1 α . Además a la inhibición enzimática, la hipoxia causa perturbaciones en la cadena transportadora de electrones, incrementando de esta manera los niveles citoplasmáticos de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales oxidan el Fe²⁺ (cofactor para la actividad de las hidroxilasas) a Fe³⁺ que no puede ser utilizado. Esta alteración inhibe la actividad de las hidroxilasas y promueve la estabilización del HIF-1 α (Simon, 2006).

Muchos tumores sólidos tienen regiones pobremente vascularizadas, que sufren hipoxia y carencia de nutrientes, lo que induce la activación del HIF-1 y el consecuente incremento en la expresión de la mayoría de las enzimas de la glucólisis (HK I y HK II; PFK-1L, PFKFB-3, ALD-A, GAPDH, PGK-1, ENO-1, PK-L y PK-M y LDH-A), lo que conlleva a una estimulación del flujo glucolítico (Dang y Semenza, 1999; Minchenko et al., 2003; Dang et al., 1997). Interesantemente, el HIF-1 α se detecta en tumores malignos pero no en tejidos sanos o tumores benignos (Guppy et al., 2002; Robey et al., 2005). En algunos tumores agresivos la proteína Von Hippel – Lindau se encuentra

mutada convirtiéndose en un inefectivo promotor en la degradación del HIF-1 α , lo que tiene como consecuencia una elevada expresión de este factor y un incremento en la glucólisis aun en presencia de oxígeno.

Myc

Las proteínas Myc (L-Myc, N-Myc y c-Myc), son miembros de una familia de factores de transcripción del tipo helice-bucle-helice-leucina cierre, involucrados en la regulación de la proliferación celular, apoptosis y crecimiento celular (*Baena et al., 2005*). De esta forma, el gen *c-myc* es uno de los primeros genes en activarse cuando la célula va a dividirse. Una vez transcrito, la proteína codificada por este gen se une a una proteína llamada Max y forman complejos c-Myc-Max que se unen a secuencias específicas del ADN, próximas a genes muy importantes para la proliferación celular. Cuando los protooncogenes de la familia *myc* se activan, se produce una mayor proliferación celular (*Pardo-Mindán, 1997*).

c-myc se convierte en oncogénico cuando es desregulado o sobre expresado, causando tumorigénesis en modelos de animales transgénicos (*Oster et al., 2002*).

Se ha determinado que c-Myc estimula la expresión de genes de enzimas de la glucólisis como LDH-A, PFK-1 L, ENO-1, HPI, GAPDH y PK-M (*Dang et al., 1997; Osthus et al., 2000; Shim et al., 1997; Dang y Semenza, 1999*), por lo que su sobreexpresión en células tumorales contribuye a una glucólisis desmedida.

1.3.2 Isoformas de las enzimas glucolíticas expresadas en las células tumorales

Transportador de glucosa (GLUT)

Hay varias isoformas de GLUT (GLUT1 – GLUT12), GLUT1 está presente en todos los tejidos y es la isoforma predominante en muchas células tumorales (*Medina y Owen, 2002; Wood y Trayhurn, 2003*).

Está documentado que los niveles del transportador de glucosa son más altos en las células tumorales, lo que podría ser parte de los mecanismos promotores del incremento en la glucólisis en este tipo de células (*Medina y Owen, 2002; Wood y Trayhurn, 2003; Macheda et al., 2005*).

Hexocinasa (HK)

En las células de mamíferos hay 4 isoformas de HK (HK I – HK IV) que difieren en sus propiedades cinéticas (*Cornish-Bowden y Cardenas, 1991; Wilson, 2003*). En las células tumorales la HK II parece ser la isoforma predominante, excepto en los tumores cerebrales donde la HK I es la isoforma sobreexpresada, la cual se encuentra tanto unida a la membrana externa mitocondrial como libre en el citosol (*Nakashima et al., 1988; Wilson, 2003; Pedersen et al., 2002*). La G6P es un potente inhibidor de HK I, HK II y HK III (*Wilson, 2003*). En células tumorales, la HK II se une a canales transmembranales mitocondriales formados por la porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), lo que hace que disminuya la inhibición que ejerce la G6P, brinda protección frente a las proteasas y permite el acceso directo al ATP de la mitocondria. La proteína proapoptótica Bax forma con VDAC el canal a través del cual se libera el citocromo c de la mitocondria

después de un estrés apoptótico. Según parece, la sobreexpresión de HK II protege a las células tumorales de la acción de Bax y, por lo tanto, de la apoptosis (*Pastorino et al., 2002; Seixas da-Silva et al., 2004*).

Fosfofructocinasa tipo 1 (PFK-1)

Hay tres tipos de subunidades de PFK-1 (L, M y C). En diferentes tumores malignos la subunidad C, L ó ambas prevalecen sobre la subunidad M (*Vora et al., 1985; Sánchez-Martínez y Aragón, 1997; Oskam et al., 1985*). Cada subunidad de PFK-1 muestra diferentes propiedades cinéticas. La PFK-1 de tumores es menos sensible a la inhibición por citrato, fosfoenolpiruvato y ATP que la PFK-1 normal, lo que le permite mantenerse activa y contribuir al incremento de la glucólisis (*Oskam et al., 1985; Staal et al., 1987; Sánchez-Martínez et al., 2000; Meldolesi et al., 1976*). En tejidos normales, la PFK-1 es inhibida alostéricamente por un aumento en la concentración de protones en el citosol (pH ácido). Este mecanismo regulatorio permite que la glucólisis disminuya su actividad cuando la concentración intracelular de los intermediarios glucolíticos es alta. Sin embargo, en células tumorales la reducción en el pH citosólico no modifica la actividad de la PFK-1, por lo que siempre permanece en estado activo (*Aguirre y Sotelo, 2008*). En glioma humano, la PFK-1 es muy sensible a la activación por F-2,6-BP, bloqueando la inhibición por citrato y ATP (*Staal et al., 1987*). Interesantemente, la F-2,6-BP es el activador más potente que se conoce de la PFK-1 y cuya concentración se encuentra elevada en las células tumorales.

Fosfofructocinasa tipo 2 (PFK-2).

Es una enzima bifuncional con actividades de cinasa y fosfatasa, la cual modula los niveles celulares de F-2,6-BP, un potente activador de PFK-1. Existen cuatro isoenzimas: PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB-3 y PFKFB-4 (*Okar et al., 2001*), de las cuales la isoforma PFKFB-3 es la que se expresa en las células tumorales. La PFKFB-3 tiene una actividad más elevada de cinasa que de fosfatasa, lo cual causa una acumulación de la F-2,6-BP. La acumulación de la F-2,6-BP promueve que la PFK-1 se mantenga activa, lo cual contribuye a que la glucólisis permanezca alta y a la pérdida del efecto Pasteur (*Minchenko et al., 2003; Atsumi et al., 2002*).

1.3.3 Enzimas que controlan el flujo de la glucólisis en las células normales y en las células tumorales

Una vía metabólica se caracteriza por tener una reacción limitante, ser regulada y llevarse a cabo en sitios específicos de la célula.

El control de una vía metabólica está determinado por aquellas enzimas que debido a sus propiedades cinéticas mantienen una baja actividad, que limita el flujo de metabolitos de la vía.

Algunos de los procedimientos seguidos para establecer que enzimas controlan una vía metabólica son los siguientes:

- a) Identificación del paso o los pasos limitantes de la velocidad de la vía.

Una aproximación *in vitro* es medir en un extracto celular la velocidad de todas las enzimas en el sentido directo y reverso de la vía, con la finalidad de obtener un cociente de velocidad directa/velocidad reversa; mientras más pequeño sea este valor, menos probable es que la enzima

sea un punto de control de la vía, porque indicaría que la reacción es fácilmente reversible.

- b) Identificación *in vitro* de los efectores alostéricos de las enzimas que catalizan las reacciones limitantes del flujo de la vía metabólica.
- c) Medición *in vivo* de los reguladores propuestos, en diferentes condiciones, para establecer si esos cambios de concentración, son compatibles con los mecanismos de control propuestos (Voet, 1992).

Es reportado que la glucólisis en algunos tipos de células de mamíferos está controlada por la hexocinasa (HK) y la fosfofructocinasa tipo I (PFK-I) entre un 70 % y un 30%, respectivamente (Rapoport *et al.*, 1974). En las células tumorales AS-30D (de rata) este porcentaje cambia, de tal forma que la HK junto con el transportador de glucosa controlan un 71% (Marín-Hernández *et al.*, 2006).

Una de las explicaciones de la pérdida de control por parte de la PFK-1 tumoral es la acumulación de la F-2,6-BP, que bloquea la inhibición por citrato y ATP (Fig. 3). Por otra parte la HK sigue controlando a pesar de encontrarse unida a la mitocondria, debido a que la G6P mantiene una fuerte inhibición sobre ella.

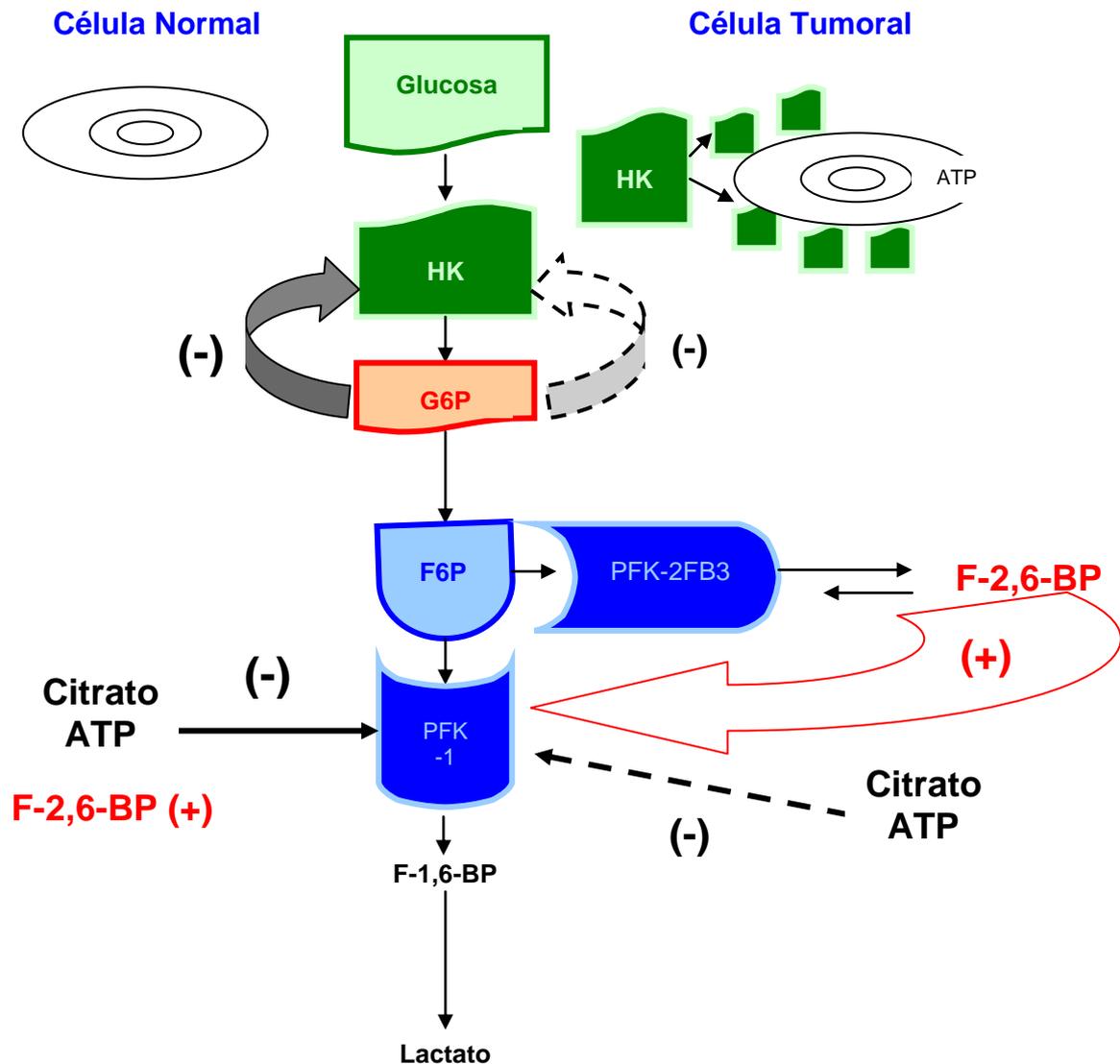


Figura 3. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA HK Y LA PFK-1 EN UNA CÉLULA NORMAL Y EN UNA CÉLULA TUMORAL.

HK, hexocinasa; G6P, glucosa 6 fosfato; PFK-1, fosfofructocinasa tipo 1; F-1,6-BP, fructosa 1,6 bifosfato; PFK-2FB3, isoenzima de la fosfofructocinasa tipo 2; F-2,6-BP, fructosa 2,6 bifosfato. En una célula tumoral la hexocinasa se encuentra unida a la membrana mitocondrial, lo que contribuye a que exista menos inhibición por la G6P. Así también, esta unión la provee del ATP mitocondrial, lo que influye en que esta enzima se encuentre más activa que en una célula normal, en donde si es inhibida por su producto (G6P). En lo referente a la PFK-1, esta enzima se encuentra más activa con respecto a una célula normal debido a que en una célula tumoral es expresada la PFK-2, particularmente su isoenzima PFK-2FB3, la cual tiene más actividad de cinasa que de fosfatasa, lo que permite la acumulación de F-2,6-BP, compuesto que es un potente activador de la PFK-1 y bloquea la inhibición de esta enzima por citrato y ATP, manteniéndola más activa con respecto a una célula normal, donde si ocurre la inhibición de la actividad de PFK-1 en presencia de citrato y ATP.

1.3.4 Procesos que se favorecen con el incremento en la glucólisis

Proliferación

El incremento en la glucólisis en células tumorales es una respuesta a la demanda de un elevado requerimiento energético (ATP) para mantener activa la proliferación celular (*Moreno-Sánchez et al, 2007*). Sin embargo, es reportado que en muchas células tumorales, a pesar de una incrementada glucólisis, su total contribución al suministro de ATP celular es sólo del 10% (*Zu y Guppy, 2004*), en contraste con otras líneas tumorales en donde la glucólisis soporta el 50-70% de la demanda de ATP (*Warburg, 1956*). Esto se debe a que en algunas líneas tumorales el resto de ATP es aportado por la fosforilación oxidativa. Se ha demostrado que la actividad mitocondrial es esencial para la rápida replicación del tumor sólido, mientras que la importancia de la glucólisis radica en que provee de esqueletos carbonados utilizados en la biosíntesis de macromoléculas requeridas en la replicación tumoral (ADN, triglicéridos y proteínas) (*Rodríguez-Enriquez, 2007*).

Angiogénesis

En condiciones fisiológicas las células se localizan a una distancia de entre 100 y 200 μm de los vasos sanguíneos, su fuente de oxígeno. Cuando un organismo multicelular está creciendo las células inducen angiogénesis con la finalidad de poseer nuevos suministros de sangre.

En condiciones patológicas como el cáncer, la angiogénesis es requerida para la sobrevivencia y proliferación del tumor. El medioambiente de un tumor sólido humano es caracterizado por regiones hipóxicas, por lo que

surge la necesidad del desarrollo de una red de vasos sanguíneos dentro del tumor para el suministro de oxígeno y nutrientes. Células tumorales localizadas a una distancia mayor de 100 μm de los vasos sanguíneos se convierten en hipóxicas (*Tonini et al., 2003*). La hipoxia por medio del HIF-1 α , induce la expresión de factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) de tal forma que si la concentración de los factores proangiogénicos, es mayor que la de los factores antiangiogénicos ocurrirá la angiogénesis (*Liotta y Stetler-Stevenson, 1991*).

La angiogénesis tumoral consta de los siguientes pasos (Fig. 4):

- a) Los factores proangiogénicos producidos por las células tumorales se unen a los receptores de las células endoteliales. Cuando las células endoteliales son estimuladas a crecer, secretan proteasas, enzimas digestivas que digieren la membrana basal que está rodeando a los vasos sanguíneos.
- b) Las células endoteliales comienzan a migrar y proliferar dentro de la masa tumoral.
- c) Las células endoteliales recientemente formadas crean una nueva membrana basal para la estabilidad vascular. Los nuevos vasos sanguíneos forman el flujo sanguíneo dentro del tumor (*Tonini et al., 2003*).

En las células tumorales el fenotipo glucolítico evoluciona en un microambiente que es avascular, por lo que el “switch glucolítico” (adquisición del fenotipo glucolítico) ocurre antes que el “switch angiogénico” (Adquisición del fenotipo angiogénico) (*Gatenby y Gillies, 2004*).

ANGIOGENESIS TUMORAL

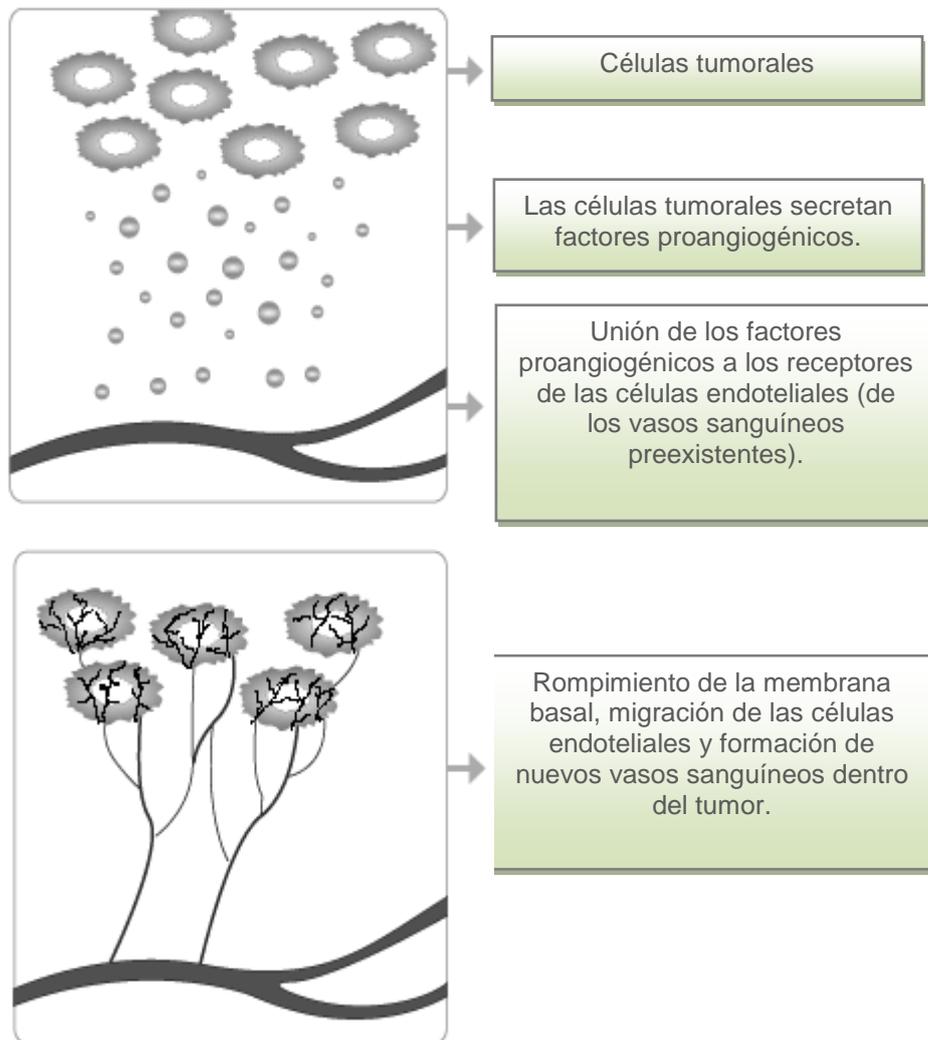


Figura 4. ANGIOGÉNESIS TUMORAL

Figura que muestra los procesos que ocurren durante la angiogénesis en las células tumorales.

Acidosis e invasión

Una glucólisis constitutiva y persistente resulta en una aguda y crónica acidificación del ambiente local. Se ha demostrado que el pH extracelular en tumores humanos y animales es consistentemente ácido y puede alcanzar valores de pH cercanos a 6.0 (*Raghunand et al., 2004; Gillies et al., 2002*). Las células normales carecen de un mecanismo de adaptación a la acidosis extracelular (como mutaciones en *p53*) y son incapaces de sobrevivir bajo tales condiciones, mientras que las poblaciones tumorales continúan su proliferación. Además, la acidosis puede ser mutagénica y clastogénica (*Morita et al., 1992*), posiblemente por medio de la inhibición de la reparación del ADN. Finalmente, bajo algunas condiciones, los pH bajos estimulan la invasión *in vitro* (*Martinez-Zaguilan et al., 1996*) y la metástasis *in vivo* (*Schlappack et al., 1991*). Los mecanismos por los cuales son inducidos no se conocen, pero podrían involucrar metaloproteínas y/o catepsinas, las cuales promueven la degradación de la matriz extracelular (ECM) (componente que rodea y soporta las células en los tejidos y que está compuesto de proteínas y polisacáridos) y la membrana basal (*Rozhin et al., 1994; Montcourrier et al., 1997*).

Metástasis

El fenotipo glucolítico podría ser crucial también en la maduración y metástasis de las células tumorales. La elevada glucólisis, evidenciada por un incremento en las concentraciones de lactato intratumoral, se asocia con incrementos en la incidencia de metástasis en algunos tipos de cáncer (*Brizel et al., 2001; Walenta et al., 2000*). Además, se ha reportado una correlación entre los niveles de expresión de GLUT 1 y de metaloproteínas en cánceres

metastáticos (*Ito et al., 2002*). Durante el proceso de metástasis, las células migratorias invaden el tejido estromal y se mueven a sitios distantes alojándose en precapilares, arteriolas y capilares (*Al-Mehdi et al., 2000; Wong et al., 2002*). Estas células probablemente experimentan episodios periódicos de hipoxia ó anoxia y proliferan y obstruyen el espacio intravascular. Por lo tanto, en los estadios finales de la secuencia metastásica se verán favorecidas las células que son glucolíticas y resistentes a la hipoxia.

1.4 Terapias contra el cáncer

Por lo general, el tratamiento de tumores malignos se basa, según los casos, en el empleo aislado, simultáneo o sucesivo de tres terapias principales: la cirugía oncológica, la radioterapia y la quimioterapia, a las que en algunas ocasiones se añaden la hormonoterapia, la inmunoterapia y el apoyo de la terapia metabólica.

Cirugía oncológica

Constituye la modalidad terapéutica más frecuentemente utilizada, bien sea en forma aislada o en combinación con otros métodos, para el tratamiento de las neoplasias sólidas localizadas, o de aquellas que en su evolución, no han sobrepasado el nivel de los ganglios linfáticos regionales (*Gonzalez-Barón et al., 1998; Díaz-Rubio y García, 2000*).

Desventajas

Es practicable siempre y cuando las neoplasias no hayan sobrepasado el nivel de los ganglios linfáticos regionales. Otras limitantes para su práctica son: cuando el crecimiento local o la extensión regional hacen imposible la exéresis oncológica y cuando la localización anatómica de la neoplasia hace que su extirpación ponga en riesgo de muerte al paciente (*Gonzalez-Barón et al., 1998; Díaz-Rubio y García, 2000*).

Radioterapia

La radiación ioniza el medio interno celular, provocando la formación de radicales hidroxilo, fundamentalmente a partir de las moléculas de agua. Estos radicales, que tienen una intensísima afinidad por los electrones de las moléculas circundantes, lesionan el ADN “robándole” electrones. Sin embargo, los radicales hidroxilo tienen una vida muy corta y en consecuencia su radio de acción es muy limitado. La presencia de oxígeno en el medio celular favorece la estabilidad de los radicales hidroxilos, permitiéndoles ampliar su radio de acción y, por tanto, su efecto lesional. Las células de los tejidos con un alto índice de recambio son las más sensibles a los efectos de la radiación. También se han demostrado efectos sobre otros componentes celulares, como membranas y microtúbulos, que podrían actuar como coadyuvantes en la muerte celular (*Gonzalez-Barón et al., 1998; Díaz-Rubio y García, 2000*).

Desventajas

El oxígeno es el más potente de los radiosensibilizantes conocidos, de tal forma que en algunos tumores sólidos la ineficiencia de la radioterapia se

debe al microambiente hipóxico que circunda al tumor (*Gorlach y Acker, 1994; Sutherland, 1988; Vaupel et al., 1989*). Se ha estimado que las células bien oxigenadas de mamíferos pueden ser de 2.5 a 3 veces más sensibles a la radiación que las células hipóxicas.

Todos los órganos y sistemas pueden presentar efectos secundarios debidos a la radioterapia en función de la radiosensibilidad del tejido conjuntivo vascular y el endotelio. Sin embargo, la función de los órganos con un índice de recambio celular más alto se afectará tempranamente (*Gonzalez-Barón et al., 1998; Díaz-Rubio y García, 2000*).

Quimioterapia

El tratamiento quimioterapéutico estándar incluye la administración de fármacos que pueden tener alguno de los siguientes mecanismos de acción: intercalarse en el ADN, inhibir la acción de la topoisomerasa, afectar al citoesqueleto ó la angiogénesis (*Gibbs, 2000*). Dentro de estos fármacos se encuentran: agentes alquilantes, antibióticos antineoplásicos, alcaloides de la vinca, antimetabolitos, cis-platino y derivados, entre otros citostáticos. El principal objetivo de la quimioterapia debe ser la mayor destrucción tumoral posible. Para ello se han desarrollado estrategias de acción como la poliquimioterapia, la combinación de la quimioterapia con irradiación y la modulación bioquímica. Esta última consiste en la potenciación de la actividad antineoplásica de un fármaco quimioterapéutico, por la adición de fármacos que actúan de forma selectiva en alguna de las vías bioquímicas (*Gonzalez-Barón et al., 1998; Díaz-Rubio y García, 2000*).

Desventajas.

Los fármacos empleados también dañan a las células proliferativas normales del hospedero. Varios tipos de cánceres presentan resistencia inherente o adquirida a los fármacos antineoplásicos. La quimioterapia puede generar toxicidad hematológica, gastrointestinal, renal, pulmonar, cardiovascular y cutánea, entre otras más (*Gonzalez-Barón et al., 1998; Díaz-Rubio y García, 2000*).

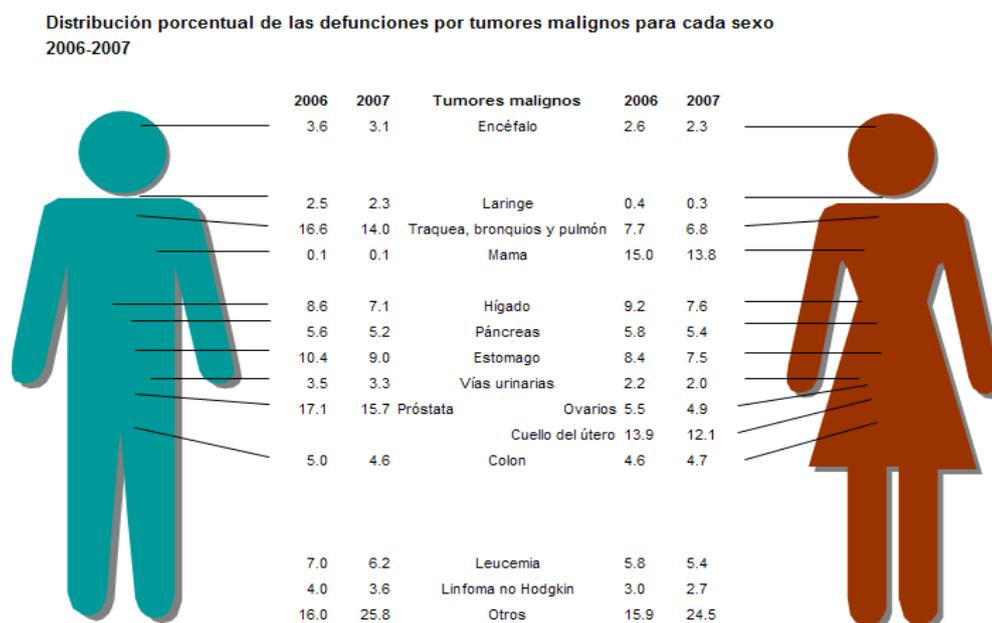
Importancia del fenotipo glucolítico en la terapéutica del cáncer

La crucial importancia del fenotipo glucolítico es enfatizada por estudios que demuestran que el incremento en glucólisis coincide con la transición de lesiones pre-malignas a cáncer invasivo, ya que altos niveles de lactato se han propuesto como un indicador de malignidad (*Walenta et al., 2000*). Así también hay una correlación directa entre la progresión del tumor y el incremento en las actividades de HK y PFK-1 (*Marín-Hernández et al., 2006; Pedersen et al., 2002; Sánchez-Martínez et al., 2000*), de tal forma que estas enzimas podrían ser un posible blanco terapéutico contra el cáncer.

Debido a que este fenotipo surge tempranamente en la carcinogénesis, podría representar un posible blanco en la prevención del cáncer. La continuidad en el análisis de este fenotipo y una mejor comprensión de sus consecuencias moleculares y fisiológicas, llevaría a la propuesta de probables blancos terapéuticos.

1.5 El cáncer en México

De acuerdo a datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), en el 2007 los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte entre las mujeres, con 35 303 defunciones (15.4 %), mientras que en los hombres fue la cuarta con 33 509 muertes (11.8%). A pesar de que el porcentaje de muertes por cáncer de mama disminuyó del 15% al 13.8% del 2006 al 2007, continúa siendo la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres mexicanas (Fig. 5). En 2002 se notificaron 3,822 muertes por esta causa, lo que corresponde a una tasa de mortalidad de 15.18 defunciones por 100 mil mujeres de 25 años y más. Esta tasa representa la cifra más alta jamás alcanzada por el país y significa que diariamente mueren un poco más de 10 mexicanas por cáncer mamario (*INEGI. Estadísticas Demográficas 2006; INEGI. Serie Estadísticas Vitales*).



Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales. Defunciones 2006 y 2007. Base de datos.

Figura 5. EL CÁNCER EN MÉXICO

El esquema muestra por sexo el porcentaje de muerte debido a los diferentes tipos de tumores malignos en México. En general, puede observarse una disminución de la mortalidad causada por los diferentes tipos de cáncer del 2006 al 2007; sin embargo, el cáncer de mama continúa siendo la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres.

CAPÍTULO 2

2.1 Planteamiento del problema

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres mexicanas. A pesar de las diferentes terapias existentes, no se ha logrado controlar debido a la heterogeneidad tumoral, lo que indica la necesidad de estudios más exhaustivos para un mejor conocimiento de los mecanismos que están rigiendo el comportamiento tumoral de este tipo de cáncer. La mayoría de las células tumorales se caracterizan por una glucólisis desmedida, debido a que han perdido los principales mecanismos de control y porque se ven sometidas (en muchos casos) a bajas tensiones de oxígeno, que las hace depender del ATP generado por esta vía metabólica. Por tal motivo, el estudio de la glucólisis en células tumorales de cáncer de mama y una determinación cuantitativa de las enzimas que pueden estar controlando esta línea tumoral, sería una aportación de gran importancia en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

2.2 Hipótesis

La hexocinasa (HK) es la enzima que controla principalmente la glucólisis en las células tumorales de cáncer de mama MDA-MB 231.

2.3 Objetivo General

Caracterizar la glucólisis en las células tumorales de mama MDA-MB 231.

2.4 Objetivos Particulares

- Purificar la PPI-PFK de papa para cuantificar la F-2,6-BP.
- Determinar las concentraciones intracelulares de ATP, G6P, F6P y F2-6BP.
- Determinar las velocidades máximas de la HK y la PFK-1 en extractos citosólicos de células MDA-MB 231.
- Determinar los flujos de la primera sección de la glucólisis (HK a TIM).
- Determinar la velocidad de la glucólisis en las células MDA-MB 231.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas tumorales:

1) **MDA-MB 231:** Esta línea celular es conocida por provenir de sitios metastásicos.

| | |
|------------------------------------|---|
| No. ATCC: | HTB-26™ |
| Propiedades de crecimiento: | Adherencia |
| Morfología: | Epitelial |
| Organismo: | <i>Homo sapiens</i> (Humanos) |
| Origen: | Órgano: Glándula mamaria; seno |
| | Enfermedad: Adenocarcinoma |
| | Derivado del sitio metastásico: Efusión pleural |
| | Tipo de célula: Epitelial |
| Edad: | 51 años |
| Género: | Femenino |
| Grupo étnico: | Caucasio |
| Comentarios: | Las células expresan el oncogén WNT7B |

<http://www.atcc.org>

Cultivo de las células

Las células MDA-MB 231 fueron cultivadas en medio de cultivo Eagle's Dulbecco's modificado (DME). Al medio se le adicionó 3.7 g/L de NaHCO₃, HEPES 6 g/L, 10 000 U de penicilina/estreptomicina y suero fetal bovino al 5%; dicho medio se esteriliza por filtración usando una membrana de poro 0.22µm. Las células se incubaron a 37 °C hasta obtener una confluencia de 90-95%.

Cosecha u obtención de las células

Se retiró el medio de cultivo de las cajas Petri y se realizaron tres lavados de las células con medio Ringer-Krebs pH 7.4 (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM, KH₂PO₄ 1.3 mM, CaCl₂ 1.4 mM y MgCl₂ 1 mM). Con ayuda de un raspador y con un poco de medio Ringer Krebs se despegaron las células del fondo de la caja Petri y se fueron acumulando en un tubo para centrifuga. Posteriormente se centrifugó la suspensión de células a 2500 rpm por 2 min a temperatura ambiente. Por último se cuantificó la proteína celular por el método de Biuret (ver Apéndice).

2) AS-30D

| | |
|-------------------------------|---|
| No. DSMZ: | ACC 208 |
| Tipo celular: | Hepatoma de rata |
| Origen: | Estabilizado a partir del hepatoma de una rata hembra de 16 meses de edad en 1988. |
| Morfología: | Crecen como células individuales en suspensión |
| Tiempo de duplicación: | Aprox. 29 h |
| Cantidad de células: | Aprox. 0.6 x10 ⁶ células/mL |
| Citogenética: | 12% de tetraploidia |
| Micoplasma: | Tinción con DAPI negativa, cultivos microbiológicos, ensayos de hibridación de RNA. |

<http://www.dsmz>

Obtención de las células.

Las ratas hembras con un peso de 250 a 300 g se inocularon intraperitonealmente con 2-4 X 10⁸ células/mL. Aproximadamente a la semana, desarrollaron el hepatoma y fueron sacrificadas por dislocación cervical. Posteriormente, con ayuda de una jeringa estéril se les extrajo el hepatoma y con 5 mL se inocularon otras dos ratas. Al hepatoma extraído se le agregó medio Ringer Krebs pH 7.4 y se centrifugó a 2000 rpm durante 3 min; se descartó el sobrenadante y se volvió agregar medio Ringer Krebs. Este

procedimiento se realizó hasta obtener una suspensión de células libres de eritrocitos. Se cuantificó la proteína por el método de Biuret.

3.2 Cuantificación de la fructosa 2,6 bisfosfato (F-2,6-BP)

Conforme a estudios previos, uno de los métodos más sensibles para determinar la concentración de F-2,6-BP en tejidos y células tumorales se basa en la propiedad de este metabolito para activar a la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (PPI-PFK) de plantas y a su propiedad de ser destruido bajo condiciones ácidas (*Van Schaftingen et al., 1982*).

La PPI-PFK se descubrió primeramente en *Entamoeba histolytica* (*Reeves et al., 1974*). La misma enzima se encontró en varias bacterias, en piña y en frijol. La observación realizada por Sabularse y Anderson a cerca de que la actividad de la enzima del frijol se incrementa en presencia de F-2,6-BP abrió en aquellos años un nuevo camino en la investigación (*Sabularse y Anderson, 1981*).

La gran sensibilidad de la PPI-PFK de plantas a F-2,6-BP a diferencia de la PPI-PFK de *Entamoeba histolytica*, la convierte en una herramienta apropiada para la cuantificación de F-2,6-BP. En investigaciones preliminares se encontró que varias plantas, incluyendo espinaca, aguacate, plátano y papa, podrían ser usadas como fuente de la enzima; sin embargo la papa es la elegida por su fácil adquisición durante todo el año, y la extrema sensibilidad de su PPI-PFK a la estimulación por F-2,6-BP que puede ser activada por cantidades de este metabolito del orden de picomoles (0.1 – 4 nM) (*Van Schaftingen et al., 1982*).

3.2.1 Purificación de la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (PPi-PFK)

Para extraer la PPi-PFK se utilizó 1 Kg de papas, a las cuales se les retiró la cáscara y se cortaron en trozos pequeños. Posteriormente, se licuaron en un medio que contenía HEPES 20 mM pH 8.2, DTT 2 mM, acetato de potasio 20 mM, pirofosfato de sodio 2 mM y $MgCl_2$ 2 mM, todo permaneció en frío. En seguida, se filtró la mezcla y al filtrado se le ajustó el pH a 8.2 a una temperatura de 0 °C. Después, el filtrado se somete a calentamiento hasta 59 °C en un baño a 70 °C; alcanzados los 59 °C se mantuvo a esta temperatura por un tiempo de 5 min. Concluido este tiempo se ajustó el pH a 7.1 a una temperatura de 0 °C. Una vez ajustado el pH, se agregaron 6 g de polietilenglicol 6000 por cada 100 mL de filtrado, se mezcló por 15 min y se dejó en reposo otros 15 min. Pasado este tiempo, se centrifugó por 10 min a 6000 rpm y se recobró el sobrenadante. Al sobrenadante obtenido se le agregó 8 g de polietilenglicol 6000 por cada 100 mL de sobrenadante, se mezcló por 15 min y se dejó en reposo otros 15 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó por 10 min a 6000 rpm. Se recuperó el botón, el sobrenadante se centrifugó a 6000 rpm por 5 min (este proceso se repitió 2 veces) y se fue recuperando el botón que finalmente se resuspendió en Tris-HCl 20 mM pH 8.2 con KCl 20 mM, DTT 2 mM y PMSF 1 mM. La muestra obtenida se pasó por una columna de intercambio iónico (DEAE-SEPHACEL). Para ello, primeramente se equilibró la columna con 50 mL de solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM pH 8.2 conteniendo KCl 20 mM y DTT 2 mM; en seguida se aplicó la muestra. Una vez que la muestra quedó cargada en la columna, se aplicó nuevamente una cantidad Buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.2 conteniendo KCl 20 mM y DTT 2 mM hasta que la absorbencia a 280 nm llegó nuevamente a la basal. Una vez

obtenida una absorbencia basal se generó un gradiente lineal de KCl de 20 a 400 mM (solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM pH 8.2 conteniendo KCl 20 mM y DTT 2mM y solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM pH 8.2 conteniendo KCl 400 mM y DTT 2mM) y se fueron colectando las diferentes fracciones. Se midió la actividad en las fracciones que mostraron los picos máximos de absorbencia. La fracciones que contenían a la enzima se concentraron (Amicon Ultra-15 centrifugal filter) y se guardaron en 50% de glicerol a -20 °C.

3.2.2 Preparación de extractos básicos para cuantificar la F-2,6-BP

Una preparación de células AS-30D y de células MDA-MB 231 a una concentración de 15 mg/mL y de 3 – 8 mg/mL, respectivamente, se incubaron a 37 °C en agitación constante de 150 rpm por 10 min; al término de la incubación se agregó 5 mM de glucosa y se incubaron por 3 min. Transcurrido este tiempo se tomó 1 mL de células que se centrifugaron por 10 s a 14000 rpm; se eliminó el sobrenadante y el botón se colocó en nitrógeno líquido y se resuspendió en Tris-HCl 25 mM pH 7.6, se congelaron y descongelaron 3 veces. En seguida, se centrifugaron por 3 min a 14000 rpm (4°C), se tomó el sobrenadante y se le agregó NaOH para obtener una concentración final de 0.1 mM. Posteriormente se calentaron en parrilla por 5 min a 80 °C. Al término de este tiempo, se centrifugaron por 4 min a 14000 rpm y se neutralizó el sobrenadante con ácido acético.

3.2.3 Cuantificación de la F-2,6-BP en los extractos básicos

Para la cuantificación de F-2,6-BP el medio de reacción contenía: MgCl₂ 5 mM, fructosa 6 fosfato (F6P) 5 mM, NADH 0.15 mM, Aldolasa (ALD)

desalada 0.36 U, α -Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa + triosa isomerasa (α -GDH+TIM) desaladas 0.62 U y 18 U, respectivamente, PPI-PFK 0.01 U, medio Tris-HCl 25 mM pH 7.6, el cual se incubó por 2 min con el extracto básico a 37 °. La reacción se inició con pirofosfato de sodio 0.5 mM. Se midió la desaparición de NADH a 340 nm. Previamente, se preparó una curva patrón de concentración de actividad de PPI-PFK vs F-2,6-BP (nM). Las concentraciones empleadas de F-2,6-BP fueron 0, 0.5, 1, 2, 4 y 10 nM que corresponden a una cantidad de 0, 0.5, 1, 2, 4 y 10 pico moles de F-2,6-BP debido a que el volumen final del ensayo fue de 1 mL.

3.3 Preparación de extractos citosólicos

Una vez obtenidas las células (procedimiento previamente descrito), se cuantificó la proteína celular por el método de Biuret para calcular la cantidad de medio (Tris-HCl 25 mM pH 7.6 con EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y DTT 5 mM) necesario para resuspender el botón de células, con base a la relación 10 mL de medio por cada 650 mg de proteína. La suspensión de células obtenida se congeló en N₂ líquido y descongeló a 37 °C (este procedimiento se repitió 2 veces). Después se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a la temperatura mencionada. Se desechó el botón obtenido y se cuantificó la proteína en el sobrenadante por el método de Lowry (Apéndice). Los extractos obtenidos se guardaron en 10% de glicerol a -72 °C para la posterior medición de actividad de la HK, de la PFK-1 y de los flujos de la primera sección de la glucólisis (HK a TIM).

3.3.1 Medición de la actividad de la HK

Se llevó a cabo en medio MOPS 50 mM con pH 7 que contenía NADP⁺ 1 mM, MgCl₂ 15 mM, ATP 10 mM y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) 1U. Se inició la reacción con glucosa 2 mM, después de haber incubado el extracto por 1 min. La temperatura empleada para el ensayo fue de 37 °C y se midió la aparición de NADPH siguiendo los cambios en la absorbancia a 340 nm (Fig. 6).

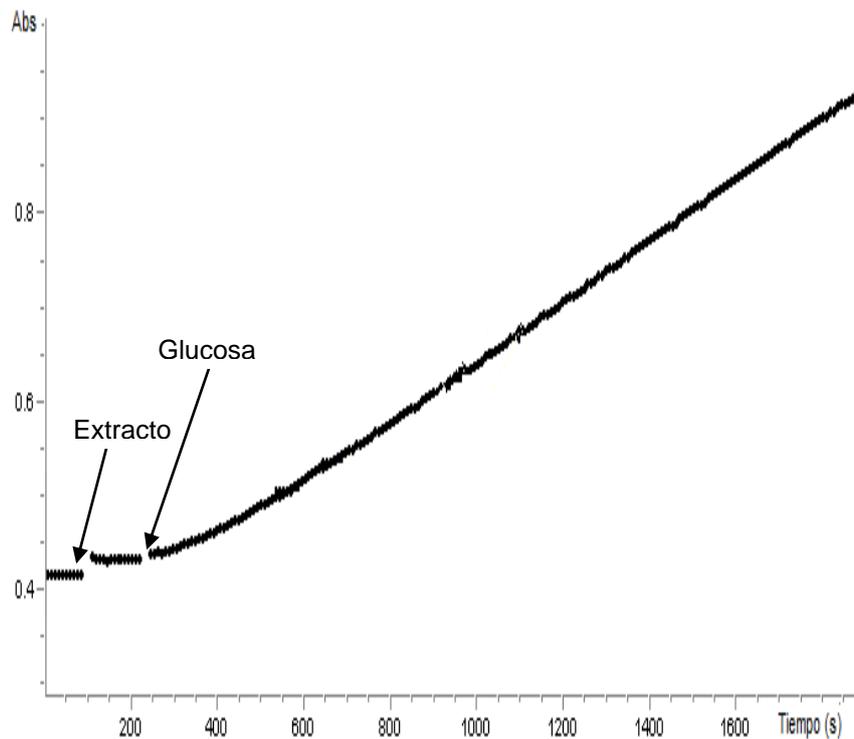


Figura 6. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA HK
Se observa el incremento en la absorbancia a través del tiempo, debido a la formación del NADPH.

3.3.2 Medición de la actividad de la PFK-1

Se realizó en medio MOPS 50 mM con pH 7 que contenía $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 1 mM, NADH 0.15 mM, α -GDH 0.62 U + TIM 18 U, ALD 0.36 U, ATP 0.8 mM y F-2,6-BP 5 μ M. Se inició la reacción con F6P 5 mM, después de haber incubado el extracto por 1 min. La temperatura empleada para el ensayo fue de 37 °C y se midió la desaparición de NADH siguiendo los cambios en la absorbencia a 340 nm (Fig. 7).

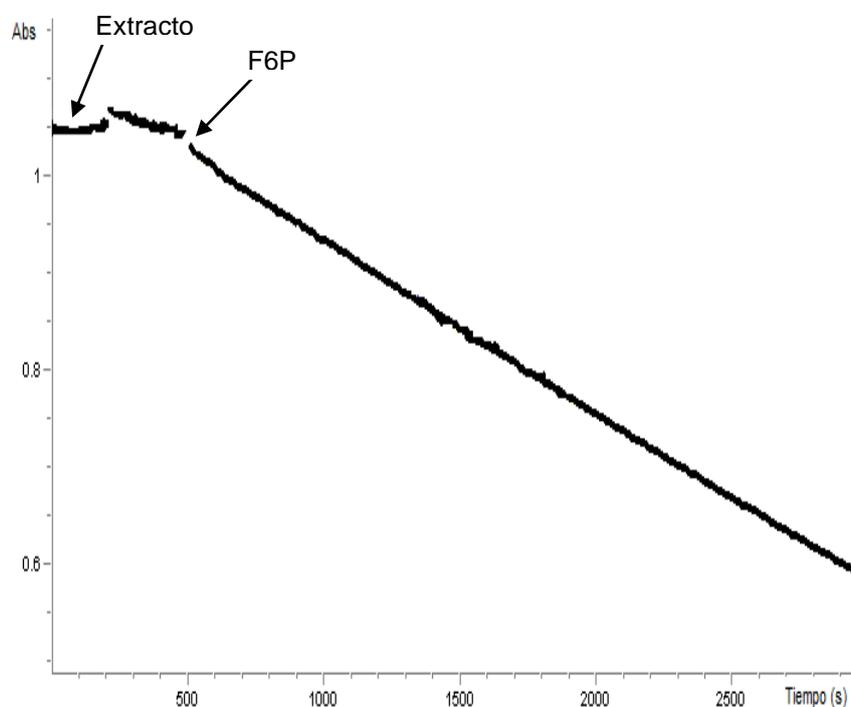


Figura 7. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PFK-1
Se observa la disminución en la absorbencia a través del tiempo, debido al consumo del NADH.

3.3.3 Medición de flujos de la primera sección de la glucólisis (flujos HK a TIM)

Los ensayos se realizaron en medio MOPS 50 mM con pH 7 que contenía $MgCl_2$ 15 mM, ATP 10 mM, NADH 0.15 mM, α -GDH 0.62 U y F-2,6-BP 6 μ M. Se incubó el extracto citosólico por 1 min y se inició la reacción con glucosa 2 mM para medir el flujo a partir de la HK, con glucosa 6 fosfato (G6P) 10 mM para medir el flujo a partir de la hexosa fosfato isomerasa (HPI), con F6P 5 mM para medir el flujo a partir de la PFK-1 y con fructosa-1,6-bifosfato (F-1,6-BP) 1 mM para medir el flujo a partir de la ALD (los ensayos para determinar los flujos a partir de cada enzima se realizaron en cubetas individuales) (Fig. 8). La temperatura empleada para el ensayo fue de 37 °C y se midió la desaparición de NADH siguiendo los cambios en la absorbencia a 340 nm (Fig.9).

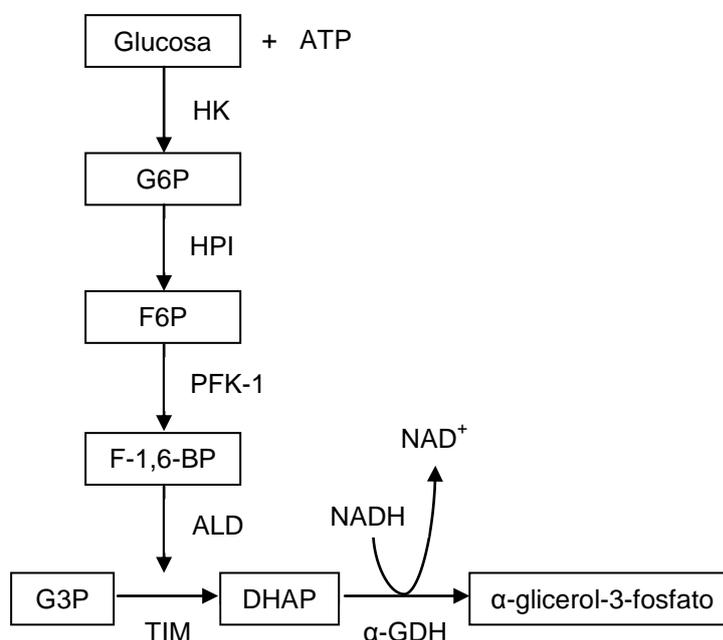


Figura 8. ESQUEMA DE LA MEDICIÓN DE FLUJOS
Se observa que independientemente de la enzima a partir de la cual se determine el flujo el producto final es el α -glicerol-3-fosfato, con consumo de NADH por parte de la alfa glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (α -GDH).

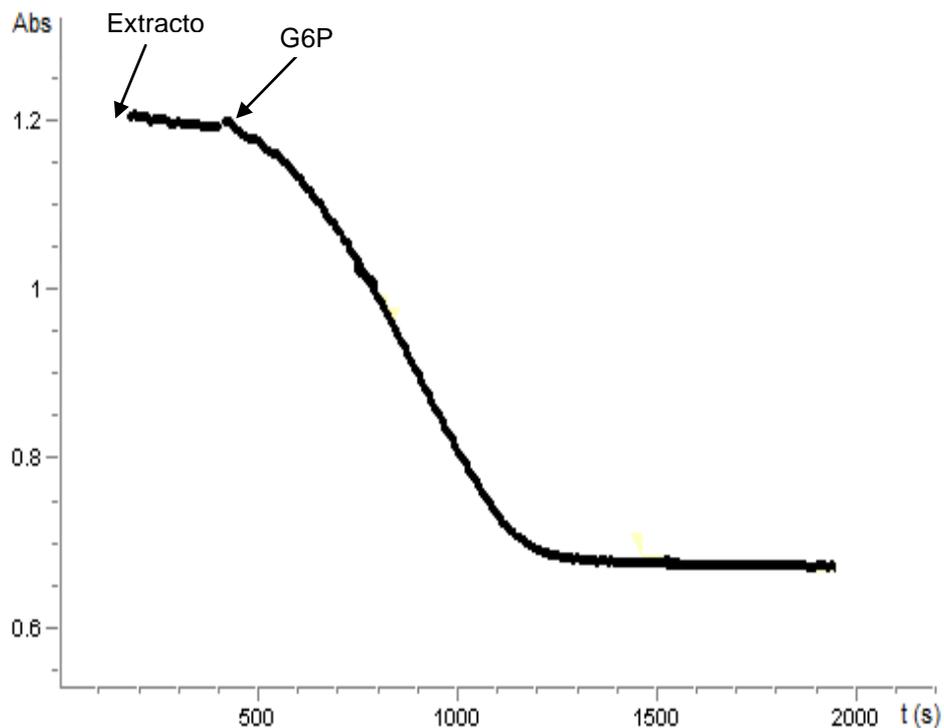


Figura 9. MEDICIÓN DEL FLUJO
 El gráfico ilustra la medición del flujo a partir de la HPI. Se observa la disminución en la absorbancia a través del tiempo, debido al consumo del NADH y producción de NAD⁺.

3.4 Preparación de extractos ácidos para cuantificar metabolitos

Una preparación de células tumorales a una concentración de 3-8 mg/mL se incubaron a 37 °C, en agitación constante por 10 min; al término de la incubación se tomó una alícuota de 500 µL de células y se colocó rápidamente en un tubo con 50 µL de HClO₄, se agregó 5 mM de glucosa a la suspensión de células restante y se incubaron por 3 min. Transcurrido este tiempo se tomó 1 mL de células y se colocaron en un tubo con 100 µL de HClO₄. Se centrifugaron ambos tubos a 2500 rpm por 2 min, se recuperó el sobrenadante y se neutralizó con KOH 3M + Tris 0.1 M. Una vez concluida la neutralización se volvió a centrifugar a 2500 rpm por 2 min. Los extractos

obtenidos se guardaron a $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior cuantificación de la G6P, de la F6P, del ATP y del lactato.

3.4.1 Cuantificación de la G6P, de la F6P y del ATP

La cuantificación se realizó en medio HEPES 50 mM, EGTA 1 mM y pH 7.4, en presencia de los siguientes reactivos: MgCl_2 5 mM, glucosa 2 mM, NADP^+ 1 mM y 400 μL del extracto ácido a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para iniciar la reacción, primeramente se agregó G6PDH 1 U para cuantificar la G6P, HPI 3.5 U para cuantificar la F6P y por último HK 0.5 U para cuantificar el ATP. Se midieron los cambios de absorbencia por aparición de NADPH a 340 nm (Fig. 10).

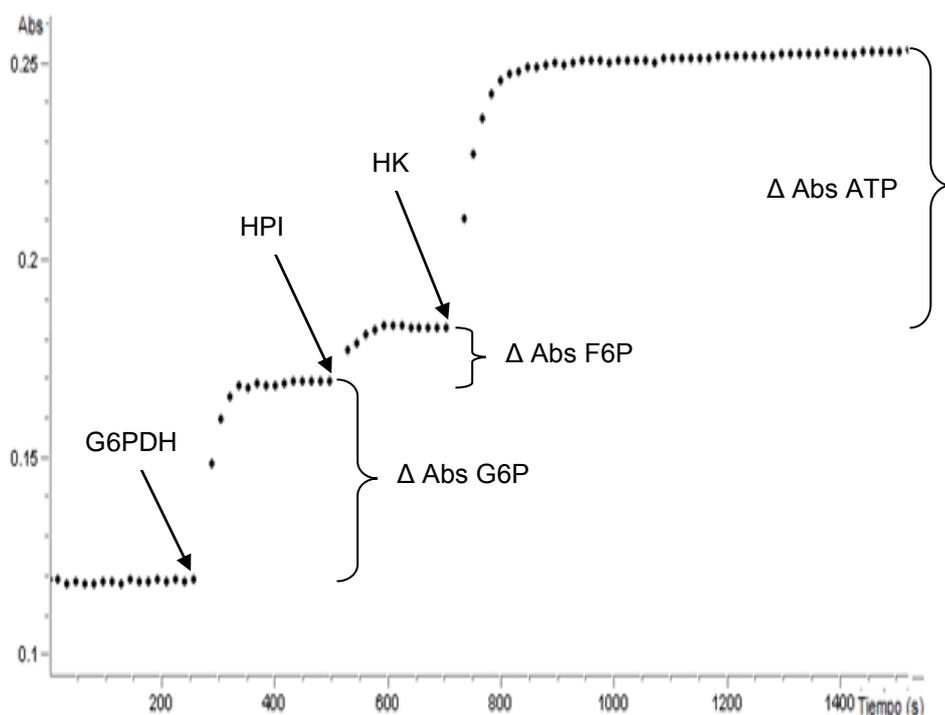


Figura 10. CUANTIFICACIÓN DE G6P, F6P Y ATP
Se observa el cambio de absorbencia (Δ Abs) correspondiente a la cuantificación de la G6P, de la F6P y del ATP. Estos cambios son debidos a la formación de NADPH.

3.4.2 Cuantificación del lactato

En medio hidrazina 0.4 M + glicina 0.5 M (pH 9), en presencia de NAD^+ 1 mM y lactato deshidrogenasa (LDH) 27.5 U a 37 °C se cuantificó el lactato. La reacción se inició con la adición de 100 μL de extracto ácido y se cuantificó el lactato por aparición de NADH a 340 nm (Fig. 11).

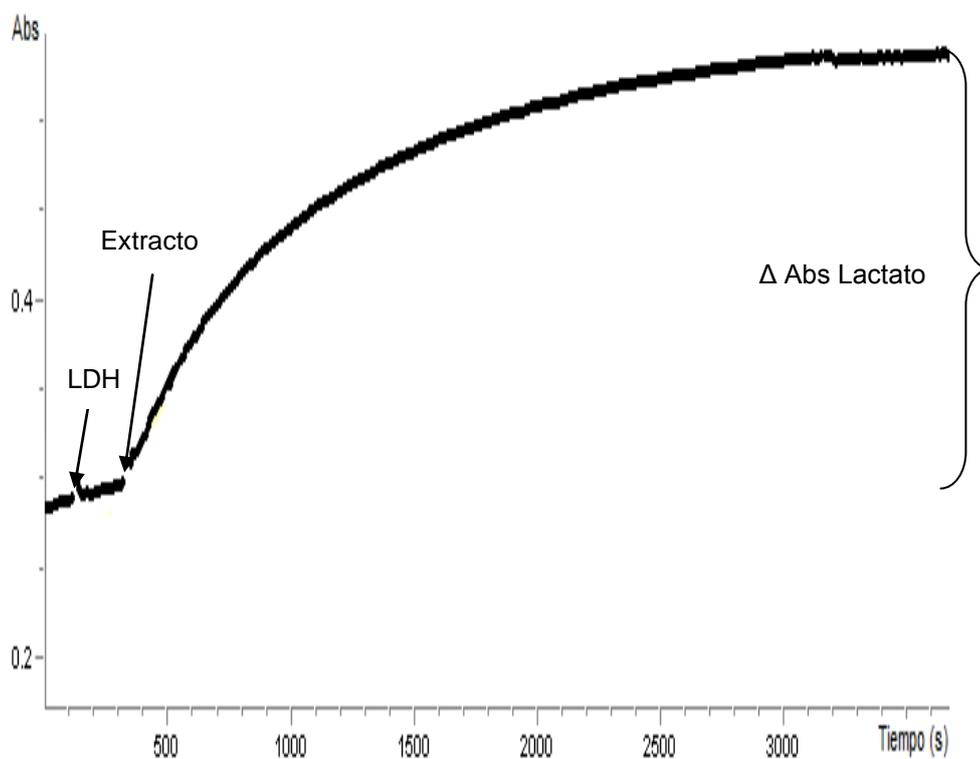


Figura 11. CUANTIFICACIÓN DE LACTATO

Se observa el cambio de absorción correspondiente a la cuantificación de lactato debido a la formación de NADH.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la F-2,6-BP

4.1.1 Purificación de la PPI-PFK

Se realizaron cuatro purificaciones de la PPI-PFK de papa (Tabla 1), en las cuales se tomaron diferentes fracciones a lo largo del procedimiento de extracción de la enzima, con la finalidad de monitorear que la actividad específica se fuera incrementando conforme se avanzaba de un paso a otro y detectar si existía una etapa del proceso en la cual se perdiera actividad. Tal fue el caso en la primera purificación, en la que se observó una disminución en la actividad específica de la fracción 3 a la fracción 6, que se atribuye a una pérdida de la enzima al no recolectar el sobrenadante de la 2da. precipitación, ya que el control 1 (2.7 U/mg) presentó una mayor actividad específica que la fracción 6 (1.07 U/mg). Por tal motivo en la 2da. purificación se recolectó el sobrenadante de la 2da. precipitación, se centrifugó 2 veces y se colectaron los botones. Para determinar que no había más enzima activa en el sobrenadante después de las 2 centrifugaciones se tomó una muestra (control 2), en la cual ya no se observó actividad. En esta purificación después de pasar la muestra por una columna de intercambio iónico, las fracciones obtenidas se pasaron por una columna de exclusión molecular, sin embargo, la actividad obtenida fue muy similar a la que se obtenía sólo con una columna de intercambio iónico por lo que en las posteriores purificaciones únicamente se utilizó una columna de intercambio iónico y se disminuyó la toma de fracciones, debido a que con las purificaciones 1 y 2 fue posible determinar en que etapas había pérdida de la actividad de la enzima.

Tabla 1. Fracciones obtenidas durante las purificaciones de la PPI-PFK de papa

| FRACCIONES | 1ª. Purificación | | | | 2da. Purificación | | | | 3ra. Purificación | | | | 4ta. Purificación | |
|---|------------------|---------|-----------|--------------|-------------------|---------|-----------|--------------|-------------------|---------|-----------|--------------|-------------------|---------|
| | A.E (U/mg) | A.T (U) | Rend. (%) | Veces Purif. | A.E (U/mg) | A.T (U) | Rend. (%) | Veces Purif. | A.E (U/mg) | A.T (U) | Rend. (%) | Veces Purif. | A. E (U/mg) | A.T (U) |
| 1.- Extracto crudo. | 0.09 | 211 | 100 | 1 | 0.045 | 558.03 | 100 | 1 | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT |
| 2.- Antes de realizar la 1ª. precipitación. | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT | 0.023 | 143.04 | 100 | 1 | MNT | MNT |
| 3.- Después de precipitar con polietilenglicol 8000 al 6%. | 2.63 | 66.4 | 31 | 29.22 | 0.016 | 173.69 | 31.13 | 0.36 | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT |
| 4. Después de precipitar con polietilenglicol 8000 al 8%. | MNT | MNT | MNT | MNT | 0.014 | 98.11 | 17.58 | 0.31 | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT |
| C1. Sobrenadante de la 2da. precipitación. | 2.7 | 39.5 | 19 | 30 | 0.62 | 130.83 | 23.45 | 13.78 | 0.56 | 5.77 | 4.04 | 24.35 | MNT | MNT |
| C2. SN obtenido de la concentración del botón. | PNR | PNR | PNR | PNR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.72 | 28.96 | 20.3 | 31.30 | MNT | MNT |
| 5.- Botón concentrado. | PNR | PNR | PNR | PNR | 1.4 | 33.58 | 6.02 | 31.11 | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT | MNT |
| 6.- Después de la ultrafiltración. | 1.07 | 8.5 | 4 | 11.89 | PNR | PNR | PNR | PNR | PNR | PNR | PNR | PNR | PNR | PNR |
| 7.- Después de la columna por intercambio iónico. | 2.96 | 11.1 | 5 | 32.89 | 9.45 | 30.31 | 5.43 | 210 | 1.24 | 6.8 | 4.75 | 53.91 | 0.20 | 0.54 |
| 8.- Fracciones por exclusión molecular concentradas en una. | PNR | PNR | PNR | PNR | 11.1 | 17.23 | 3.09 | 246.67 | PNR | PNR | PNR | PNR | PNR | PNR |

C1 y C2: control 1 y control 2, respectivamente. MNT: Muestra no tomada. A.E: Actividad específica. A.T: Actividad total. SN: sobrenadante PNR: Procedimiento no realizado. Rend: Rendimiento. Veces Purif: Veces de purificación

Al calcular promedios de las actividades (total y específica) obtenidas en las cuatros purificaciones (Tabla 2), se encontró una desviación estándar muy grande incluso superior al promedio, resultado atribuido a que no se tuvo control sobre la edad y tipo de papa.

Tabla 2. Actividad final obtenida en las purificaciones de la PPI-PFK de papa

| Purificaciones | Activ. esp. (U/mg) | Activ. Total (U) |
|-------------------|--------------------|------------------|
| 1ra. purificación | 2.96 | 11.1 |
| 2da. purificación | 9.45 | 30.31 |
| 3ra. purificación | 1.24 | 6.8 |
| 4ta. purificación | 0.20 | 0.54 |
| Promedio | 2.81 ±3.88 | 12.19±12.84 |

En la 2da. purificación de la PPI-PFK de papa, la actividad específica y actividad total obtenidas al final fueron, 9.45 U/mg y 30.31 U, respectivamente; actividades similares a las reportadas en la literatura (7.6 U/mg y 28 U) (*Van Schaftingen et al., 1982*) (Tabla 3). El protocolo seguido fue igual al reportado, con la diferencia de que en la literatura se emplearon 330 g de papa y nosotros empleamos 1 kg de papa, de tal forma que para la cantidad de papa empleada obtuvimos una menor actividad de la enzima (bajo rendimiento), probablemente por la especie de papa, la cual no se indica en el reporte señalado. Además, puede haber influido la estación del año y el periodo de tiempo en el cual se mantuvieron almacenadas antes de la venta.

Tabla 3. Comparación entre los resultados en la 2da. purificación de la PPI-PFK con los resultados reportados en literatura

| Fracciones | 2da. Purificación | | | | Literatura (<i>Van Schaftingen et al., 1982</i>) | | | |
|---|---------------------|-----------------|-------------------|------------|---|-----------------|----------------------|------------|
| | Act. Esp. (U/mg) | Veces Purif. | Act. Total (U) | Rend. % | Act. Esp. (U/mg) | Veces Purif. | Act. Total (U) | Rend. % |
| Extracto crudo | 0.045 | 1 | 558.03 | 100 | 0.049 | 1 | 65 | 100 |
| Después de precipitar con polietilenglicol 8000 al 6 %. | 0.016 | 0.36 | 173.69 | 31.13 | 0.18 | 3.6 | 57 | 88 |
| Después de precipitación con polietilenglicol al 8%. | 0.014 | 0.31 | 98.11 | 17.58 | 1.65 | 33.5 | 39.5 | 61 |
| Después de la columna por intercambio iónico. | 9.45 | 210 | 30.31 | 5.43 | 7.6 | 154 | 28 | 43 |

En estudios previos se han realizado purificaciones de la PPI-PFK de otras frutas ó tubérculos. Así por ejemplo, la PPI-PFK de hojas de piña presentó una actividad de 2.5 micromol/min*mg prot (2.5 U/mg) y en el extracto crudo entre 0.2 -0.6 micromol/min*mg prot (*Carnal y Black, 1979*). La actividad específica de la PPI-PFK de semillas frijol en el extracto crudo fue menor a 0.5 nmol/min*mg prot (*Sabularse y Anderson, 1981*). Debido a la baja actividad que se tiene de la PPI-PFK en otras frutas y tubérculos, se prefiere a la papa para la extracción de esta enzima.

4.1.2 Extracción de la F-2,6-BP

En lo referente a la extracción de F-2,6-BP con el protocolo reportado en literatura (Fig.12), no se obtuvieron resultados satisfactorios porque no permitía el rompimiento total de las células, por lo que fue necesario implementar algunas etapas (Fig.13). Una vez incubadas las células con glucosa, 1 mL de éstas se centrifugó por 10 s a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en Tris-HCl 25 Mm pH 7.6; las células fueron sometidas a un proceso de congelamiento y descongelamiento en nitrógeno líquido y posteriormente se centrifugaron por 3 min a 14000 rpm. Hasta este paso, fueron los cambios al protocolo original, después se continuó con lo ya establecido: se colocó el sobrenadante en NaOH que tuviera una concentración final de 0.1 mM, se calentó a 80 °C por 5 min, nuevamente se centrifugó a 14000 rpm, solo que únicamente por 4 min a diferencia de los 20 min señalados en el protocolo original, y por último se neutralizó el sobrenadante.

Figura 12. Protocolo reportado en literatura para la extracción de F-2,6-BP

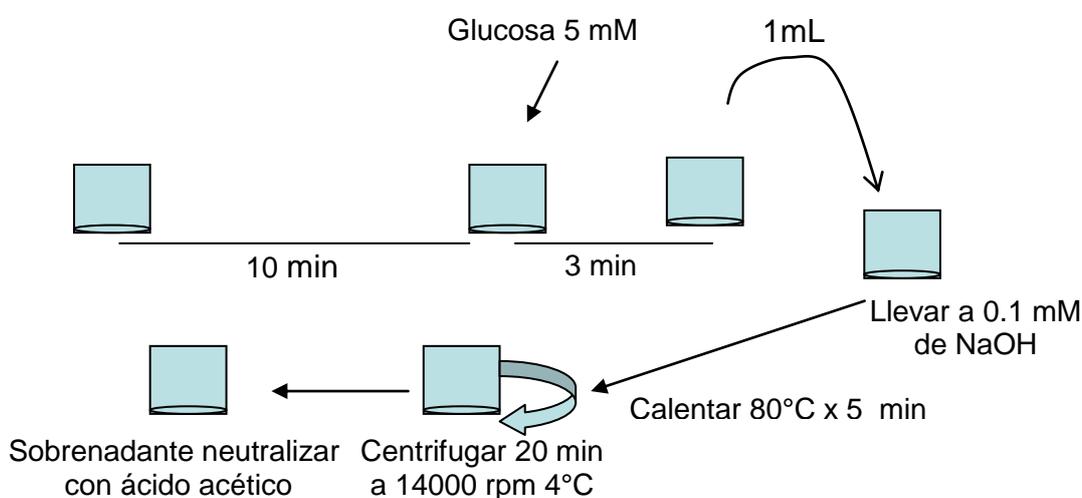
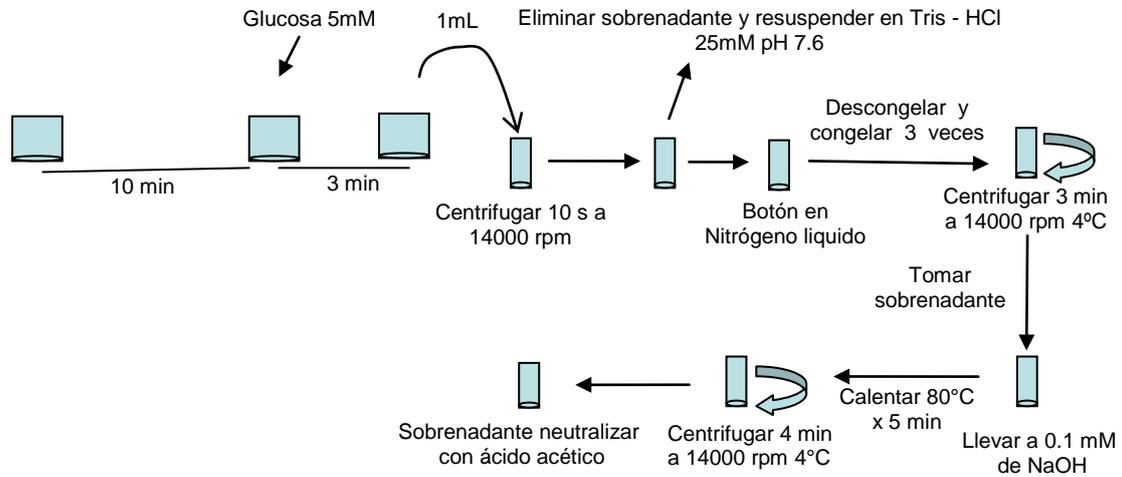


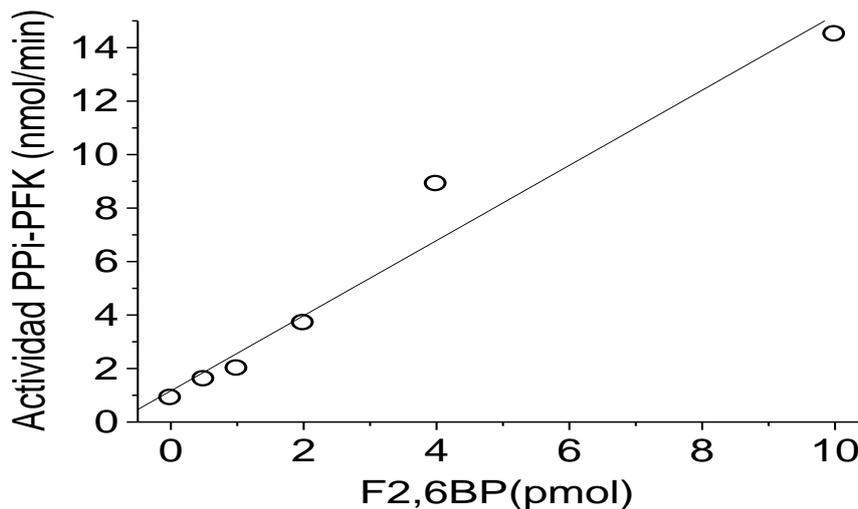
Figura 13. Modificaciones realizadas al protocolo de la literatura para la extracción de F-2,6-BP



4.1.3 Cuantificación de la F-2,6-BP

Con respecto a la cuantificación de F-2,6-BP, primeramente se determinó una curva estándar (Fig.14).

Figura 14. Curva estándar empleada para la cuantificación de F-2,6-BP



Con el empleo de la curva estándar anterior, se cuantificó la concentración de la F-2,6-BP en la línea tumoral de hepatoma de rata AS-30D y en las células de cáncer de mama MDA-MB-231, mediante un ensayo de

enzimas acoplado, previamente descrito en Materiales y métodos. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de esta cuantificación, con sus respectivas desviaciones estándar, el número de determinaciones realizadas entre paréntesis, las concentraciones de F-2,6-BP reportadas en la literatura en diferentes líneas tumorales y la cantidad de F-2,6-BP en células normales.

Tabla 4. Comparación de la concentración de F-2,6-BP encontrada en AS-30D y MDA-MB 231 con las concentraciones reportadas en otras líneas tumorales y células normales

| | | pmol/mg de proteína | μM^* |
|---------------|--|---|--|
| Línea tumoral | AS-30D (hepatoma de rata) | 7.6 \pm 1.3 (3) | 6 \pm 1 (3) |
| | MDA-MB-231 (cáncer de mama) | 16.3 \pm 4 (3) | 13 \pm 3 (3) |
| | HT29 (adenocarcinoma de colon humano) | 40 (<i>Denis et al., 1986</i>) | 8.5 |
| | HeLa (cáncer cérvico uterino humano) | 81 (<i>Mojeda et al., 1985</i>) | NR |
| | Erlich ascites tumor | 26.7 (<i>Nissler et al., 1995</i>) | NR |
| | HTC (hepatoma de rata) | 5.2 (<i>Loiseau et al., 1985</i>) | NR |
| | Células normales | Hepatocitos de rata | 3.7 - 6 (<i>Loiseau et al., 1985; Marin-Hernández et al., 2006</i>) |

* La concentración en AS-30D y MDA-MB-231 se calculó considerando el volumen intracelular reportado para AS-30D 2.28 μL / 1.8 mg (*Rodríguez-Enríquez et al., 2000*).

NR: No reportado.

La F-2,6-BP se encontró incrementada en células de AS-30D y en células de cáncer de mama MDA-MB 231, con respecto a hepatocitos normales (Tabla 4). En estudios previos, se han reportado incrementos de este metabolito en otras líneas tumorales (Tabla 4), en la mayoría se reporta una cantidad más elevada que en AS-30D y en MDA-MB 231, lo que podría deberse a que se trata de células tumorales de diferente tejido y al estadio de diferenciación en el que se encuentren. Es importante señalar que en la mayoría de los reportes previos se siguió el procedimiento descrito por Van Schaftingen para la cuantificación de F-2,6-BP, con excepción de las células HT29, en las cuáles se aplicó el procedimiento descrito por Van Schaftingen; pero con una previa sonificación de las células para el rompimiento de las membranas celulares. En nuestro caso para lograr una mejor extracción de F-2,6-BP sometimos a las células a un choque térmico mediante congelamiento en N₂ y descongelamiento a 37 °C y posteriormente seguimos el procedimiento descrito por Van Schaftingen. Sin embargo, el choque térmico no fue suficiente para el rompimiento total de las membranas celulares y la completa extracción de F-2,6-BP, ya que no se logró obtener un extracto transparente y poco viscoso, lo que podría subestimar la concentración de F-2,6-BP encontrada en AS-30D y MDA-MB 231, pero a pesar de este inconveniente, la cantidad cuantificada es mayor con respecto a hepatocitos normales.

La F-2,6-BP es un potente activador de la PFK-1. Todos los estudios previos (Tabla 4) señalan que en una célula tumoral la concentración de F-2,6-BP se encuentra más incrementada que en un tejido normal, lo que concuerda con la concentración encontrada en AS-30D y MDA-MB 231, esto

nos indicaría que la PFK-1 se va a mantener más activa y por lo tanto, tendría un menor control en la glucólisis. Es reportado (*Marín-Hernández et al., 2006*) que la PFK-1 no ejerce control en la glucólisis de células tumorales, como lo hace en las normales, debido a que una concentración de F-2,6-BP de aprox. 5 μM evita la inhibición ejercida por el citrato y el ATP sobre esta enzima en extractos celulares de AS-30D. Por lo tanto, 6 y 13 μM , concentraciones encontradas en AS-30D y MDA-MB 231, respectivamente, son suficientes para evitar dicha inhibición.

4.2 Actividades de la HK y de la PFK-1

Se determinaron las actividades máximas de HK y PFK-1 en MDA-MB 231, observándose que ambas enzimas presentan una actividad muy similar (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad de la HK y de la PFK-1 en extractos celulares de MDA-MB 231

Actividades máximas de las enzimas glucucolíticas, HK y PFK-1, en la línea tumoral de cáncer de mama MDA-MB 231, mediante un ensayo de enzimas acoplado, previamente descrito en Métodos. Se muestran los resultados obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar y el número de determinaciones realizadas entre paréntesis.

| Enzima | Actividad(U/mg) |
|--------|---------------------|
| HK | 0.06 \pm 0.02 (5) |
| PFK-1 | 0.05 \pm 0.02 (5) |

De acuerdo a estudios previos (*Marín-Hernández et al., 2006*), en hepatocitos aislados la HK y PFK-1 se encuentran entre las enzimas de menor

actividad y se sabe que estas enzimas juegan un papel muy importante en el control del flujo glucolítico en tejido normal. Sin embargo en las células tumorales existe una pérdida de este control y en algunos casos una sobreexpresión de dichas enzimas. En el caso de la línea tumoral MDA-MB 231 de cáncer de mama (Tabla 5) se observa un incremento en la actividad máxima de estas enzimas de 20 veces para HK y de 5 veces para PFK-1 con respecto a hepatocito (HK 0.003 U/mg de prot y PFK-1 0.01 U/mg prot (*Marín Hernández et al., 2006*)). Sin embargo al comparar la actividad de HK y PFK-1 de MDA-MB 231 con las reportadas en AS-30D (0.46 y 0.21 U/mg prot, HK y PFK-1, respectivamente) (*Marín Hernández et al., 2006*), en MDA-MB 231 son un orden de magnitud menores. Esto puede obedecer al estadio de diferenciación en el que se encuentre cada línea tumoral y a que una es humana y otra de rata. Al comparar las actividades de HK Y PFK-1 de MDA-MB 231 con las reportadas para HeLa (0.02 y 0.09 U/mg prot, HK y PFK-1, respectivamente) (*Marín Hernández et al., 2006*), se encontró que la HK de MDA-MB 231 es 3 veces más activa que la HK de HeLa, mientras que la PFK-1 de HeLa es 2 veces más activa que la PFK-1 de MDA-MB 231. La actividad de las enzimas HK y PFK-1 de las tres líneas tumorales mencionadas, en una mayor o menor proporción se encuentra incrementada con respecto a las reportadas para hepatocitos. El incremento de la actividad de estas dos enzimas con respecto a células normales ha sido reportado en estudios previos. Por ejemplo, en células tumorales de páncreas RINm5F la HK tiene un incremento del 159% con respecto a células normales de páncreas (*Rasschaert y Malaisse, 1995*) y en hepatoma de rata HTC la PFK-1 se encontró incrementada 4 veces con respecto a hígado (*Loiseau et al., 1985*). En el caso

de la HK tal incremento puede deberse a que la HKII es la isoforma que más se sobreexpresa en células tumorales y que se encuentra tanto unida a la membrana externa mitocondrial como libre en el citosol. La G6P es un potente inhibidor de la HKII. Esta enzima se une desde el citosol a canales transmembranales mitocondriales formados por la porina, lo que hace que disminuya la inhibición que ejerce la G6P, brinda protección de las proteasas y provee de acceso directo al ATP de la mitocondria.

Con respecto a la PFK-1, el incremento en su actividad puede deberse a que la isoenzima expresada es la L ó C. Dichas isoenzimas de acuerdo a la literatura son menos sensibles a la inhibición por ATP y citrato (inhibidores alostéricos). Así también el incremento en actividad podría deberse a la elevada concentración de F-2,6-BP (13 μ M) en esta línea tumoral con respecto a hepatocitos normales; la F-2,6-BP es un potente activador de esta enzima y de acuerdo a reportes a partir de 5 μ M, bloquea la inhibición del ATP y del citrato (*Marín-Hernández et al., 2006*).

4.3 Determinación de los flujos

De acuerdo a la Tabla 5, la HK y PFK-1 presentan una velocidad máxima muy similar, por lo que sería difícil determinar cual de las dos está ejerciendo un mayor control. Cabe mencionar que la velocidad máxima únicamente evalúa la cantidad de enzima activa y se mide en ausencia de sus inhibidores fisiológicos, en concentraciones saturantes de sustratos y en ausencia de sus productos, lo que no ocurre bajo condiciones fisiológicas de control de flujo. Por tal motivo se determinaron los flujos para esta línea tumoral (Tabla 6), observándose que el flujo a partir de la HK es el mas bajo.

Tabla 6. Flujos en extractos celulares de MDA-MB 231

Flujos medidos a partir de las enzima HK, HPI, PFK-1 y ALD, bajo condiciones cercanas a las fisiológicas. Se muestra la enzima con su respectivo sustrato, así como los resultados con sus desviaciones estándar y el número de determinaciones realizadas entre paréntesis

| Sustrato (Enzima) | Actividad (U/mg de prot) |
|--------------------------|---------------------------------|
| GLUC (HK – TIM) | 0.005 ± 0.004 (3) |
| G6P (HPI – TIM) | 0.04 ± 0.02 (4) |
| F6P (PFK-1 – TIM) | 0.08 ± 0.04 (4) |
| F-1,6-BP (ALD – TIM) | 0.11 ± 0.03 (3) |

La actividad de la PFK-1 en condiciones fisiológicas de flujo es de las mayores, después de la actividad de la aldolasa, lo que apoyaría a la diversidad de estudios acerca de que esta enzima, pierde su control en el flujo glucolítico de líneas tumorales debido a los factores anteriormente descritos.

El flujo a partir de la HK fue el menor, lo que nos indicaría que es la enzima que está ejerciendo el mayor control en esta línea tumoral, ya que en condiciones de velocidades máximas era difícil determinar entre HK y PFK-1 cuál ejercía el control, debido a que presentaron actividades muy similares (Tabla 5). De tal forma que en MDA-MB 231, a pesar de encontrarse la HK 20 veces más activa que en Hepatocito, la concentración de su producto G6P (2.4 mM Tabla 7) es suficiente para contrarrestar el efecto de su elevada actividad y de esta forma continúa ejerciendo el control en el flujo glucolítico, aunque faltaría por evaluar la actividad de GLUT 1, el porcentaje de HK mitocondrial y HK citosólica, para afirmar con toda certeza que la HK es la enzima que está controlando.

4.4 Intermediarios de la glucólisis

En MDA-MB 231 adicionalmente, se cuantificaron algunos metabolitos: G6P, F6P y ATP, como es descrito en el apartado de metodologías. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos, con el número de determinaciones realizadas entre paréntesis.

Tabla 7. Cuantificación de intermediarios de la glucólisis en MDA-MB 231

| Intermediario | mM |
|----------------------|-----------|
| G6P | 2.4 (2) |
| F6P | 2.1 (2) |
| ATP | 3.2 (2) |

En MDA-MB 231, la G6P se encuentra incrementada 2.5 veces con respecto a Hepatocito (0.96 mM) (*Marín Hernández et al., 2006*). Al parecer en esta línea tumoral ocurre lo reportado para AS-30D, acerca de que a pesar de tener una actividad de HK incrementada, la elevada concentración de su producto G6P ejerce una fuerte inhibición sobre esta enzima (*Marín Hernández et al., 2006*). De acuerdo a este estudio, tanto la hexocinasa citosólica como mitocondrial fueron inhibidas en un 81-93% por una concentración de G6P de 1 mM y en este caso la concentración de G6P en MDA-MB 231 es de 2.4 mM, concentración suficiente para ejercer el efecto inhibitorio sobre la HK, lo que se relaciona con el bajo flujo a partir de la HK en presencia de sus inhibidores fisiológicos (Tabla 6).

La concentración de F6P sustrato de la PFK-1 (así como de la PFK-2) se encuentra 5 veces incrementada con respecto a hepatocito (0.4 mM) (*Marín Hernández et al., 2006*), lo que podría contribuir a que la PFK-2, se encuentre más activa y por tal motivo exista mayor concentración de F-2,6-BP. Además

cabe señalar que de acuerdo a estudios previos la isoenzima de la PFK-2 que más se sobreexpresa en células tumorales es la PFKFB-3, la cual tiene una actividad más elevada de cinasa que de fosfatasa, lo que también tiene como consecuencia una acumulación de F-2,6-BP. (Minchenko *et al.*, 2003; Atsumi *et al.*, 2002) y por consiguiente una mayor actividad de PFK-1 y la pérdida del efecto Pasteur.

En cuanto a la concentración de ATP en esta línea tumoral no se observó un incremento (3.2 mM) con respecto a hepatocitos normales (3.6 ± 0.24 mM) (Marín Hernández *et al.*, 2006). Se puede proponer que en MDA-MB 231 el ATP no ejerce el efecto inhibitorio sobre la PFK-1, ya que de acuerdo a estudios realizados por Marín Hernández, una concentración de 5 µM de F-2,6-BP es suficiente para bloquear el efecto inhibitorio de 3.9 mM de ATP sobre la PFK-1.

4.5 Glucólisis

Con la finalidad de evaluar si MDA-MB 231 presenta alta glucólisis en presencia de oxígeno, se determinó la velocidad de glucólisis para esta línea tumoral. Para tal propósito se cuantificó la cantidad de lactato producido, tanto en presencia de 5 mM de glucosa (C/G) como en ausencia de glucosa (S/G), tal como es descrito en Métodos. El objetivo de cuantificar el lactato en ausencia de glucosa es para garantizar que el flujo glucolítico neto depende sólo de la glucosa externa. En esta línea tumoral la cantidad de lactato sin agregar glucosa fue un resultado negativo, lo que nos indicaría que no existió un suministro endógeno de glucosa por degradación de glucógeno o bien que los 10 min previos de incubación son suficientes para eliminar el glucógeno

existente. Para obtener la velocidad de la glucólisis, la cantidad del lactato formada se dividió entre el tiempo de incubación con glucosa (3 min). En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos con el número de determinaciones realizadas entre paréntesis.

Tabla 8. Velocidad de la Glucólisis en MDA-MB 231

| Condición | Lactato (nmol/min*mg de prot) |
|-----------|-------------------------------|
| S/G | -18.8 (1) |
| C/G | 17.2 ± 9.4 (4) |

La velocidad glucolítica en MDA-MB 231 fue de 17.2 nmol de lactato/min*mg de prot, una velocidad glucolítica menor a las reportadas para AS-30D y HeLa (21 y 32 nmol de lactato/min*mg de prot, respectivamente) pero mucho mayor a la velocidad glucolítica presente en hepatocitos normales (2.4 nmol de lactato/min*mg de prot) (*Marín Hernández et al., 2006*), resultado que apoya a la gran variedad de estudios previos, acerca de que muchas líneas tumorales de rápido crecimiento muestran una glucólisis desmedida con altos niveles de producción de lactato, aun en presencia de oxígeno. Así también, la alta producción de lactato en esta línea tumoral con respecto a hepatocito es congruente con la actividad incrementada de HK y PFK-1, descritas anteriormente para esta línea tumoral.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

La purificación de la PPI-PFK de papa mediante una técnica económica, permitió obtener una actividad útil para cuantificar F-2,6-BP en extractos celulares.

La concentración de F-2,6-BP en células de AS-30D fue de 6 μM y en células tumorales de cáncer de mama MDA-MB 231 de 13 μM , valores elevados con respecto a tejido normal. Estos resultados apoyan la ausencia de control de la PFK-1 sobre la glucólisis en las células tumorales de mama.

En cambio, la HK ejerce control sobre la glucólisis debido a su baja actividad en presencia de su producto la G6P. Por lo tanto, puede proponerse como un blanco terapéutico para disminuir la glucólisis en este tipo de células tumorales.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Determinar la velocidad máxima del Transportador de Glucosa isoforma 1 (GLUT1) y el porcentaje de HK mitocondrial y HK citosólica.

CAPÍTULO 7

APÉNDICE

7.1 Columna de intercambio iónico.

7.1.1 Lavado de la columna de intercambio iónico.

- 1.- Hacer pasar por la columna 50 mL de NaCl 2 M.
- 2.- Posteriormente, se pasan 30 mL de Tris 0.1 M – NaCl 0.5 M pH 8.5.
- 3.- Después, se pasan 30 mL de acetato de sodio 0.1 M – NaCl 0.5 M pH 4.5
- 4.- Se repiten estos dos últimos pasos.
- 5.- Finalmente, se pasan 50 mL de azida 10 mM en agua.

7.2 Cuantificación de proteína.

7.2.1 Método de Biuret.

- 1.- Agregar a 6 tubos de ensayo 800 μ L de agua y 50 μ L de DOC 0.4%
- 2.- Agregar 0, 0.5, 1 y 2 mg de albúmina.
- 3.- De las muestras problema, agregar entre 10 y 20 μ L de muestra.
- 4.- Adicionar a todos los tubos 2 mL de NaOH al 10%.
- 5.- Posteriormente, agregar 100 μ L de CuSO_4
- 6.- Incubar 10 – 15 minutos y medir a 540 nm.

7.2.2 Método de Lowry.

- 1.- Preparar una dilución 1:10 de la muestra
- 2.- Agregar 0, 20, 40, 60 y 80 µg de albúmina. Llevar a 100 µL con agua.
- 3.- En otros dos tubos, agregar en uno 20 µL de la dilución de la muestra y 60 µL en el otro tubo. Llevar a 100 µL con agua.
- 4.- Preparar una mezcla de la solución A (Na_2CO_3 al 2% y NaOH 0.1M) y B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% y tartrato sódico-potásico al 2%) para Lowry, en una proporción 1:50 (B:A) y agregar 1 mL esta mezcla a todos los tubos e incubar por 15 – 20 minutos.
- 5.- Terminado el periodo de incubación, agregar a todos los tubos 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (constituido principalmente por ácido fosfomolibdotúngstico) e incubar de 15 – 20 minutos.
- 6.- Leer a 660 nm.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre CM y Sotelo MJ. *Tumores cerebrales tomo I*. 1ª. Edición. Edit. Médica Panamericana, 2008.

Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A y Muschel RJ. *Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells; a new model for metastasis*. Nature Med. **6**, 100-102, 2000.

Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R y Bucala R. *High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase (Ipfk-2:PFKFB3) in human cancers*. Cancer Res. **62**, 5881-5887, 2002.

Baena E, Gandarillas A, Vallespinós M, Zanet J, Bachs O, Redondo C, Fabregat I, Martínez-A C y Moreno AI. *c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**, 7286-7291, 2005.

Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW, Mueller-Klieser W. *Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **51**, 349-353, 2001.

Carnal WN y Black CC. *Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **86**, 20 – 26, 1979.

Cornish-Bowden A y Cardenas ML. *Hexokinase and glucokinase in liver metabolism*. Trends Biochem. Sci. **16**, 281-282, 1991.

Dang CV, Lewis BC, Dolde C, Dang G y Shim H. *Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis*. J. Bioenerg. Biomembr. **29**, 345-354, 1997.

Dang CV y Semenza GL. *Oncogenic alterations of metabolism*. Trends Biochem. Sci. **24**, 68-72, 1999.

Denis C, Paris H y Murat JC. *Hormonal control of fructose-2,6-bisphosphate concentration in the HT29 human colon adenocarcinoma cell line*. Biochem. J. **239**, 531-536, 1986.

Devlin MT. *Bioquímica*. 4ta. Edición. Edit. Reverte, S.A, 2004.

Díaz-Rubio E y García CJ. *Oncología Clínica Básica*. Ediciones ARÁN. España, 2000.

Fedele AO, Whitelaw ML, Peet DJ. *Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors*. Mol. Interv. **2**, 229-243, 2002.

Gatenby RA y Gillies Robert J. *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat. Rev. Cancer. **4**, 891-897, 2004.

Gibbs JB. *Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research.* Science **287**, 1969-1973, 2000.

Gillies RJ, Raghunand N, Karozmar G y Bhujwala Z. *MR Imaging of the tumor microenvironment.* J. Magn. Reson. Imaging **16**, 430-450, 2002.

González-Barón M, Ordoñez JA, Feliu J, Zamora P, Espinoza E y de Castro J. *Oncología Clínica: Fundamentos y Patología.* 2 Edic. Edit. McGraw-HILL. Interamericana. Madrid, España, 1998.

Gorlach A y Acker H. *pO₂-and-pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells.* Biochim. Biophys. Acta **1227**, 105-112, 1994.

Guppy M, Leedman P, Zu XL y Russell V. *Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells.* Biochem. J. **364**, 309-315, 2002.

Hue L, Blackmoreg PF, Shikama H, Robinson-Steiner A y Extony JH. *Regulation of Fructose-2,6-Bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts, and perfused hindlimbs.* J. Biol. Chem. **257**, 4308-4313, 1982.

INEGI. *Estadísticas Demográficas 2006*. Edición 2007.

INEGI. *Serie Estadísticas Vitales*. Edición 2007.

Ito S, Fukusato T, Nemoto T, Sekihara H, Seyama Y y Kubota S. *Coexpression of glucose transporter 1 and matrix metalloproteinase-2 in human cancers*. J. Natl. Cancer Instit. **94**, 1080-1091, 2002.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW y Ratcliffe PJ. *Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation*. Science **292**, 468-472, 2001.

Kashiwaya YK, Sato K, Tsuchiya N, Thomas S, Fell DA, Veech RL y Passonneau JV. *Control of glucose utilization in working perfused rat heart*. J. Biol. Chem. **269**, 25502-25514, 1994.

Kondo K y Kaelin WG. *The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene*. Exp. Cell. Res. **264**, 117-125, 2001.

Liotta LA and Stetler-Stevenson WG. *Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cancer Res. **51**, 5054s-5059s, 1991.

Loiseau MA, Rousseau GG y Hue L. *Fructose 2,6-Bisphosphate and the control of glycolysis by glucocorticoids and by other agents in rat hepatoma cells.* Cancer Res. **45**, 4263 – 4269, 1985.

Macheda ML, Rogers S y Best JD. *Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer.* J. Cell. Physiol. **202**, 654-662, 2005.

Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M y Moreno-Sánchez R. *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**, 1975-1986, 2006.

Martínez-Zaguilán R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ y Hendrix MJ. *Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells.* Clin. Exp. Metastasis **14**, 176-186, 1996.

Maxwell PH, Wiesener M, Chang GW, Clifford S, Vaux E, Cockman M, Wykoff CC, Pugh C, Maher E y Ratcliffe PJ. *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.* Nature (Lond). **399**, 271-275, 1999.

Medina RA y Owen GI. *Glucose transporters: expression, regulation and cancer.* Biol. Res. **35**, 9-26, 2002.

Meldolesi MF, Macchia V y Laccetti P. *Differences in phosphofructokinase regulation in normal and tumor rat thyroid cells*. J. Biol. Chem. **251**, 6244-6251, 1976.

Minchenko O, Opentanova I y Caro J. *Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo*. FEBS Lett. **554**, 264-270, 2003.

Mojeda M, Bosca L y Hue L. *Effect of glutamine on fructose-2,6-biphosphate and on glucose metabolism in HeLa cells and in chick-embryo fibroblast*. Biochem. J. **232**, 521 – 527, 1985.

Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I y Rochefort H. *Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by adual mechanism*. Clin. Exp. Metastasis **15**, 382-392, 1997.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A y Saavedra E. *Energy metabolism in tumor cells*. FEBS J. **274**, 1393-1418, 2007.

Morita T, Nagaki T, Fukuda I y Okumura K. *Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells*. Mutat. Res. **268**, 297-305, 1992.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA y Rodwell VW. *Bioquímica de Harper*. Edic. 14a. Edit. El Manual Moderno, S.A. de. C.V. 1997.

Nakashima RA, Paggi MG, Scott LJ y Pedersen PL. *Purification and characterization of bindale form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line.* Cancer Res. **48**, 913-919, 1988.

Nissler K, Peterman H, Wenz I y Brox Dieter. *Fructose -2,6-bisphosphate metabolism in Erlich ascites tumor cells.* J. Cancer Res. Clin. Oncol. **121**, 739-745, 1995.

Ohh M, Park CW, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Parletich N, Chau V, Kaelin WG. *Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the Von Hippel-Lindau.* Nat. Cell. Biol. **2(7)**, 423-427, 2000.

Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R y Lange AJ. *PFK-2/FBPase-2: Maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate.* Trends Biochem. Sci. **26**, 30-35, 2001.

Organización Mundial de la Salud. *Cáncer.* Nota descriptiva No. 297, Julio de 2008.

Oskam R, Rijksen G, Staal GEJ y Vora S. *Isozymic composition and regulatory properties of phosphofructokinase from well-differentiated and anaplastic meduallary thyroid carcinomas of the rat.* Cancer Res. **45**, 135-142, 1985.

Oster SK, Ho CS, Soucie EL y Penn LZ. *The myc oncogene: marvelously complex*. Adv. Cancer Res. **84**, 81-154, 2002.

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA y Dang CV. *Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc*. J. Biol. Chem. **275**, 21797-21800, 2000.

Pardo-Mindán FJ. *Anatomía patológica*. 2. edic. edit. Barcelona: Mosby/Doyma Libros, 1997.

Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. *Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax induced cytochrome c release and apoptosis*. J. Biol. Chem. **277**, 7610-7618, 2002.

Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF y Ko YH. *Mitochondrial bound type II hexokinase*. Biochim. Biophys. Acta **1555**, 14-20, 2002.

Racker E. *History of the Pasteur effect and its pathobiology*. Mol. Cell. Biochem. **5**, 17-23, 1974.

Raghunand N, Gatenby RA y Gillies RJ. *Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumors*. BR. J. Radiol. **77**, S11-S22, 2004.

Rapoport T, Heinrich R, Jaacobasch G y Rapoport S. *A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes.* Eur. J. Biochem. **42**, 107-120, 1974.

Rapoport TA, Heinrich R & Rapoport SM. *The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasy-steady states and time-dependent processes.* Biochem J. **154**, 449-469, 1976.

Rasschaert J y Malaisse WJ. *Activity of cytosolic and mitochondrial enzymes participating in nutrient catabolism of normal and tumoral islet cells.* Int. J. Biochem. Cell Biol. **27**, 195-200, 1995.

Reeves RE, South DJ, Blytt HJ y Warren LG . *Pyrophosphate: D-fructose 6 phosphate 1-phosphotransfer-ase.* J. Biol. Chem. **249**, 7737 – 7741, 1974.

Robey IF, Lien AD, Welsh SJ, Baggett BK y Gillies RJ. *Hypoxia-inducible factor-1 α and the glycolytic phenotype in tumors.* Neoplasia **7**, 324-330, 2005.

Rodríguez-Enriquez S. *Cambios en el metabolismo mitochondrial durante el crecimiento de esferoides multicelulares tumorales (MCTS) humanos.* 2do. Congreso Nacional de Química Médica, 2007.

Rodríguez-Enríquez S, Torres-Márquez ME y Moreno-Sánchez R. *Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells*. Arch. Biochem. Biophys. **375**, 21-30, 2000.

Rozhin J, Sameni M, Ziegler G y Sloane BF. *Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells*. Cancer Res. **54**, 6517-6525, 1994.

^aSabularse DC y Anderson RL. *d-fructose 2,6-bisphosphate: a naturally occurring activator for inorganic pyrophosphate:D-Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in plants*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **103**, 848 – 855, 1981.

^bSabularse DC y Anderson RL. *Inorganic pyrophosphate:D-Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in mung beans and its activation by D-fructose 1,6-bisphosphate and D-Glucose 1,6-bisphosphate*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **100**, 1423 – 1429, 1981.

Sánchez-Martínez C y Aragón JJ. *Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland*. FEBS Lett. **409**, 86-90, 1997.

Sánchez-Martínez C, Estévez AM y Aragón JJ. *Phosphofructokinase C isozyme from ascites tumor cells: cloning, expression, and properties*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **271**, 635-640, 2000.

Schlappack OK, Zimmermann A y Hill RP. *Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumor cells*. Br. J. Cancer. **64**, 663-670, 1991.

Schofield CJ y Ratcliffe PJ. *Signaling hypoxia by HIF hydroxylases*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **338**, 617-625, 2005.

Seixas da-Silva W, Gómez-Puyou A, Tuena M, Moreno-Sánchez R, De Felice FG, de Méis L, Oliveira MF y Galina A. *Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense*. J. Biol. Chem. **279**, 39846-39855, 2004.

Semenza GL. *HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia*. J. Appl. Physiol. **88**, 1474-1480, 2000.

Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungman RA, Dalla-Favera R y Dang CV. *c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 6658-6663, 1997.

Simon MC. *Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF α stabilization*. Adv. Exp. Med. Biol. **588**, 165-170, 2006.

Staal GEJ, Kalf A, Heesbeen EC, van Veelen CWM y Rijksen G. *Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas*. Cancer Res. **47**, 5047-5051, 1987.

Sutherland RM. *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science **240**, 177-184, 1988.

Tonini T, Rosi F and Claudio PP. *Molecular basis of angiogenesis and cancer*. Oncogene **22**, 6549-6556, 2003.

Torroella KM y Villa TS. *Bases genéticas del cáncer*. Instituto Nacional de Cancerología. Fondo de Cultura Económica, 1998. México, DF.

Van Schaftingen E, Lederer B, Bartrons R y Hers HG. *A Kinetic Study of Pyrophosphate: Fructose-6-Phosphate Phosphotransferase from Potato Tubers*. Eur. J. Biochem. **129**, 191-195, 1982.

Vaupel P, Kallinowski F y Okunieff P. *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*. Cancer Res. **49**, 6449-6465, 1989.

Voet D y Voet GJ. *Bioquímica. Edic. OMEGA. Barcelona, 1992*.

Vora S, Halper JP y Knowles DM. *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, 1985.

Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK y Mueller-Klieser W. *High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers.* Cancer Res. **60**, 916-921, 2000.

Warburg, O. *Ueber den stoffwechsel der tumoren.* Constable, London, 1930.

Warburg O. *On the origin of cancer cells.* Science. **123**, 309-314, 1956.

Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze C, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH y Eckardt KU. *Widespread hypoxia-inducible expresión of HIF-2 α in distinct cell population of different organs.* FASEB J. **17**, 271-273, 2003.

Wilson JE. *Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function.* J. Exp. Biol. **206**, 2049-2057, 2003.

Wong CW, Song C, Grimes MM, Fu W, Dewhirst MW, Muschel RJ y Al-Mehdi AB. *Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung.* Am. J. Pathol. **161**, 749-753, 2002.

Wood IS y Trayhurn P. *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins.* Br. J. Nutr. **89**, 3-9, 2003.

Zu XL y Guppy M. *Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 459-465, 2004.