



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS CINÉTICO Y METABÓLICO DEL CICLO DE KREBS TUMORAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. DEL MAZO MONSALVO ISIS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ÁLVARO MARÍN HERNÁNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ
COMITÉ TUTOR: DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ.
DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., JUNIO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS CINÉTICO Y METABÓLICO DEL CICLO DE KREBS TUMORAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. DEL MAZO MONSALVO ISIS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ÁLVARO MARÍN HERNÁNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ
COMITÉ TUTOR: DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ
DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., JUNIO, 2018

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de marzo de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **DEL MAZO MONSALVO ISIS** con número de cuenta **305305952**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS CINÉTICO Y METABÓLICO DEL CICLO DE KREBS TUMORAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. ÁLVARO MARÍN HERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. ÓSCAR FLORES HERRERA
Vocal: DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL
Secretario: DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
Suplente: DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS
Suplente: DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 29 de junio de 2017

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. A continuación al apoyo de la beca recibida por medio de CONACYT con el número de registro 339199 y el apoyo número 395830. Asimismo, se agradece a CONACYT por al apoyo al proyecto con No 180322, el cual permitió la adquisición de los reactivos requeridos para la realización de este proyecto.

Y finalmente al Tutor Principal del proyecto, el Dr. Álvaro Marín Hernández y a los miembros del Comité Tutor la Dra. Emma C. Saavedra Lira y el Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez. Sus conocimientos, observaciones y guía fueron invaluable.

Agradecimientos a título personal

A todo el departamento de Bioquímica y al personal del Bioterio, en el Instituto Nacional de Cardiología.

A mis profesores y compañeros de clase durante este periodo.

A Rocío Chávez Trejo, que nos ayuda a todos los alumnos más allá de lo establecido como trabajo

Gracias a todos ellos por su intervención, y hacer posible este logro

Dedicatoria

A mi familia, mis amores

ÍNDICE

Lista de figuras	i
Lista de cuadros	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
El Cáncer	4
Generalidades del ciclo de Krebs	6
Citrato sintasa	6
Aconitasa	7
Isocitrato deshidrogenasa	7
2-oxoglutarato deshidrogenasa	8
Piruvato deshidrogenasa	11
Enzima mágica	11
Glutamato deshidrogenasa	11
Glutaminasa	12
Aspartato amino transferasa	12
Enzimas del ciclo de Krebs y su relación con cáncer	15
El ciclo de Krebs tumoral	15
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
GENERAL	19
PARTICULARES	19
ANTECEDENTES	20
METODOLOGIA	22
Línea tumoral AS-30D	22
Aislamiento de mitocondrias	22
<i>Células AS-30D</i>	22
<i>Hígado de rata</i>	24

Determinación de actividades enzimáticas y parámetros cinéticos.....	24
<i>El complejo de la piruvato deshidrogenasa</i>	26
<i>Aconitasa</i>	26
<i>Isocitrato deshidrogenasa</i>	27
<i>2-oxoglutarato deshidrogenasa</i>	28
<i>Enzima málica</i>	28
<i>Glutamato deshidrogenasa (GDH)</i>	29
<i>Glutaminasa (GA)</i>	29
<i>Aspartato amino transferasa (AAT)</i>	30
Determinación de metabolitos.....	31
<i>Contenido total de magnesio y manganeso</i>	31
<i>Contenido de Mg²⁺ libre en la matriz mitocondrial</i>	31
<i>Determinación de intermediarios del ciclo de Krebs</i>	32
RESULTADOS	33
Aconitasa (AC).....	33
Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺	35
2-Oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH).....	45
El complejo de la piruvato deshidrogenasa (cPDH).....	49
Enzima málica (ME).....	50
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	51
Glutaminasa.....	51
Aspartato amino transferasa (AAT)	52
Eficiencia catalítica de las enzimas del ciclo de Krebs y anapleróticas	54
Concentración de metales (Mg ²⁺ y Mn ²⁺) y de metabolitos del ciclo de Krebs	55
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	61
LITERATURA CITADA	62

Lista de figuras

1. El ciclo de Krebs y enzimas anapleróticas.....	10
2 Cinética de activación de la aconitasa de AS-30D por MgCl ₂	34
3. Efecto del magnesio y del manganeso en la actividad de la NAD ⁺ -ICDH de hígado de rata y de las células tumorales AS-30D.....	39
4. Efecto del MgCl ₂ en la actividad de la NAD ⁺ -ICDH de hígado de rata y de AS-30D...40	
5. Inhibición de la NAD ⁺ -ICDH por NADH en presencia de MgCl ₂ y/o ADP.....	41
6. Inhibición de la NAD ⁺ -ICDH por ATP en presencia de MgCl ₂ y/o ADP.	42
7. Inhibición de la NAD ⁺ -ICDH por NADH.	43
8. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima 2-OGDH en hígado y en AS-30D.....	46
9. Inhibición de la 2-OGDH por NADH en presencia de MgCl ₂ y/o ADP.....	47
10. Inhibición de la 2-OGDH por ATP en presencia de MgCl ₂ y/o ADP.....	48
11. Efecto del MgCl ₂ y del fumarato en la actividad de la enzima málica.....	50
12. Activación de la GDH por ADP con respecto a glutamato.....	53

Lista de cuadros

1. Isoformas y estado de oligomerización de las enzimas del ciclo de Krebs.....	13
2. Isoformas y estado de oligomerización de las enzimas anapleróticas del ciclo de Krebs.....	14
3. Resumen de los parámetros cinéticos de la NAD ⁺ -ICDH de hígado rata y de las células AS-30D.....	44
4. Parámetros cinéticos de la 2-OGDH.....	46
5. Parámetros cinéticos del complejo de la PDH.....	49
6. Eficiencia catalítica (V _m /K _m) de las enzimas del ciclo de Krebs y anapleróticas.....	54
7. Contenido total de Mg ²⁺ y Mn ²⁺ en mitocondrias aisladas de hígado, AS-30D y corazón.....	56
8. Concentración de metabolitos en la matriz mitocondrial de hígado y AS-30D.....	56

RESUMEN

En las células tumorales están reportados cambios en los mecanismos de regulación de las vías metabólicas esenciales, como la glucólisis y la síntesis-degradación de glucógeno. Esto se debe a la expresión de isoformas con características cinéticas distintas (menor sensibilidad a inhibidores, mayor afinidad por activadores y/o sustratos) a las que se expresan en células no tumorales. En el caso del ciclo de Krebs se propone que los parámetros cinéticos de sus enzimas, así como la sensibilidad a sus moduladores (activadores e inhibidores) son diferentes entre las células tumorales y no tumorales, y es lo que propicia un incremento en el flujo de la vía en las células tumorales. Por lo anterior, en este trabajo se realizó la caracterización cinética de las enzimas del ciclo de Krebs y de las enzimas anapleróticas en mitocondrias aisladas de hígado de rata y de células tumorales AS-30D.

A partir de la caracterización cinética se determinó que la mayoría de las enzimas tumorales analizadas incrementaron su V_m entre 1.8 a 15 veces con respecto a las enzimas de hígado. También se encontró que en las mitocondrias tumorales se expresa una isoforma de la glutaminasa (GA) que es activada por P_i y que la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (NAD^+ -ICDH) tumoral, a bajas concentraciones de isocitrato fue más sensible al efecto inhibitorio del $NADH$ y ATP en comparación con la enzima de hígado. Finalmente, al determinar las eficiencias catalíticas se estableció que la NAD^+ -ICDH y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa son las enzimas menos eficientes en el ciclo de Krebs tanto en hígado como en las células AS-30D. Para de las enzimas anapleróticas, la

GA en hígado y la enzima málica en las células AS-30D fueron las menos eficientes, por lo que estas enzimas podrían controlar el flujo del ciclo de Krebs.

ABSTRACT

Changes in the regulatory mechanisms of essential metabolic pathways, such as glycolysis and glycogen synthesis and degradation, have been reported in tumor cells. These changes are due to the expression of isoforms with different kinetic characteristics (less sensitivity to inhibitors, greater affinity for activators or substrates, higher catalytic rate). In the Krebs cycle it is proposed that the kinetic parameters of the enzymes of this pathway as well as the sensitivity to their modulators (activators and inhibitors) are different between tumor and non-tumor cells which in turn, may be responsible of higher flux of Krebs cycle in tumor cells.. Therefore, in this work the kinetic characterization of the Krebs cycle enzymes and anaplerotic enzymes in isolated mitochondria from both, rat liver and AS-30D tumor cells was evaluated.

Results showed that most tumor enzymes increased their V_m by 1.8 to 15 times with respect to liver enzymes. In addition, it was determined that a glutaminase isoform (GA), which is activated by Pi, is expressed in tumor mitochondria; meanwhile, at low isocitrate concentrations the tumor NAD^+ -dependent isocitrate dehydrogenase (NAD^+ -ICDH) was more sensitive to the inhibitory effect of NADH and ATP than the liver enzyme. Finally, it was established that NAD^+ -ICDH and 2-oxoglutarate dehydrogenase were the least efficient enzymes in the Krebs cycle in both liver and AS-30D cells. Whilst GA in liver and malic enzyme in AS-30D were the least efficient of the anaplerotic enzymes, suggesting that these enzymes may exert the main control of the flux in the Krebs cycle.

INTRODUCCIÓN

El Cáncer

El cáncer es una enfermedad que surge de una serie de alteraciones genéticas (mutaciones, amplificaciones y pérdidas de genes) o agentes ambientales (radiación, carcinógenos y virus oncogénicos), los cambios dejan sin regulación la proliferación y la diferenciación celular, lo que propicia que una célula pueda generar un tumor (Volgelstein y Kinzler, 2004; Tysnes y Bjerkvig, 2007).

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo, y fue responsable de 8,8 millones de muertes en 2015 (OMS, 2015); sólo en el 2012, en México se reportaron casi 150 mil nuevos casos de cáncer, con una mortalidad alrededor de 80,000 casos. Los cánceres más significativos en mujeres son el de mama y el cérvico-uterino; en hombres el de próstata y de pulmón (IARC, 2012).

Las terapias tradicionales contra el cáncer (radioterapia y quimioterapia) tienen como blanco a los sistemas de duplicación y replicación del ADN, y proteínas de vías de señalización asociadas con una proliferación exacerbada. Esto hace a las células sanas que mantienen una acelerada proliferación como las epiteliales y las hematopoyéticas, susceptibles al daño inducido por el tratamiento. (Denekamp, 1980). Por lo tanto, se requiere del desarrollo de terapias más selectivas contra el cáncer basado en las diferencias entre las células tumorales y células sanas (Moreno-Sánchez et al., 2007). Por ello, encontrar diferencias a nivel molecular entre las células no tumorales y las células tumorales es esencial (Pelicano et al., 2006).

La reprogramación del metabolismo energético es una de las características recientemente añadida a la lista de *Hallmarks* que definen al cáncer; dichos marcadores engloban cambios generalizados que distinguen a este tipo de células de las no tumorales (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

Por lo anterior, diversos grupos de investigación consideran que inhibir el metabolismo energético (glucólisis y fosforilación oxidativa, FO) podría ser una adecuada estrategia en el tratamiento del cáncer (Pedersen et al., 2002; Pelicano et al., 2006; Moreno-Sánchez et al., 2007). Para que dicha inhibición sea más efectiva se debe inhibir sólo a las enzimas que controlan dichas vías metabólicas. Esto debido a que, conjuntamente a los diversos cambios que ocurren a nivel genético y de transducción de señales, la célula tumoral también depende, energéticamente, de la glucólisis y/o de la fosforilación oxidativa para obtener ATP (Moreno-Sánchez et al., 2007). En el caso de la FO se determinó que el 40% del control recae en el Complejo I de la cadena respiratoria, un 30% en las reacciones consumidoras de ATP y el 30% restante aparentemente puede encontrarse distribuido en el ciclo de Krebs, el transporte de sustratos y la fuga pasiva de protones (Rodríguez-Enríquez et al., 2000).

Existen reportes indicando que enzimas como la isocitrato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa, presentan cambios en su sensibilidad a activadores e inhibidores (Murphy et al., 1988; Lazo y Sols, 1980). Por ello, en este trabajo de tesis se realizó la caracterización cinética de las enzimas del ciclo de Krebs y las enzimas anapleróticas. Con la determinación de los parámetros cinéticos y la identificación de los posibles cambios en la regulación de la actividad de algunas enzimas del ciclo de Krebs se podrá construir un

modelo cinético que nos permita establecer los sitios de control del ciclo de Krebs que podrían ser considerados como potenciales sitios terapéuticos.

Generalidades del ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs forma parte del metabolismo energético. Entre sus funciones principales se encuentra (i) la generación de poder reductor (NADH) utilizado por el Complejo I de la cadena transportadora de electrones. La oxido-reducción de este sustrato produce transporte de electrones entre los complejos respiratorios y el bombeo de protones de los complejos I, III y IV de la matriz al espacio intermembranal. Este gradiente de protones es sustrato de la ATP sintasa para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato; (ii) síntesis de precursores para la formación de aminoácidos (2-oxoglutarato, que da lugar a glutamato, prolina y arginina), de colesterol y ácidos grasos (citrato que genera en el citosol acetil CoA y que posteriormente se emplea en la síntesis de colesterol y ácidos grasos) para la biosíntesis de membranas celulares (Lehninger et al., 2000; Müller-Esterl, 2008). El ciclo de Krebs consta de ocho enzimas, la mayoría localizadas en la matriz mitocondrial (Figura 1) excepto la succinato deshidrogenasa que se encuentra adosada en la membrana interna mitocondrial (Nelson et al., 2008; Müller-Esterl, 2008; Rogers et al., 2009). En la Tabla 1 se resumen la localización y las isoformas de cada una de las enzimas que componen al ciclo de Krebs.

Citrato sintasa (CS, EC. 2.3.3.1). Es la primera enzima del ciclo. La reacción que lleva a cabo es la condensación del oxaloacetato con la acetil coenzima A (AcCoA) para la formación de citrato, durante la reacción la coenzima A (CoA) es liberada. El valor de ΔG° para esta reacción es de -31.5 KJ/mol, resultando una reacción exergónica e

irreversible. La enzima es un homodímero que se encuentra únicamente en la matriz mitocondrial, razón por la que es utilizada como marcador mitocondrial. Su actividad es inhibida por ATP, NADH y por derivados de los ácidos grasos.

Aconitasa (AC, EC 4.2.1.3). Esta enzima isomeriza al citrato y lo transforma en isocitrato. La enzima posee un grupo hierro-azufre en su sitio activo que es altamente sensible a oxígeno, por lo que es usada como un marcador de estrés oxidativo, es decir, que es sensor intramitocondrial del estado redox (balance entre el estrés oxidativo y las defensas antioxidantes). El valor de $\Delta G'^{\circ}$ para esta reacción es de 5 KJ/mol. En el citosol se encuentran al menos 2 isoformas de esta enzima con parámetros cinéticos idénticos (Guarriero-Bobylemva et al., 1973; Eprintsev et al., 1994). Esta enzima requiere un cofactor metálico de manera esencial, además del hierro catalítico, el cual puede ser el hierro, el magnesio o el manganeso. El activador principal dependerá de la afinidad y disponibilidad del catión, el magnesio se encuentra libre a mayor concentración (0.35 – 1.5 mM), en comparación con el Mn^{2+} (80 nM / 3.4 μ M) (Rodríguez-Zavala y Moreno-Sánchez, 1998).

Isocitrato deshidrogenasa (ICDH, EC 1.1.1.41 y 2). Esta enzima es considerada como uno de los principales puntos de control del ciclo de Krebs en células no tumorales, ya que tiene regulación alostérica (Rogers y Gibon, 2009). Tiene como activadores no esenciales al ADP, al citrato y como activadores esenciales a metales catiónicos divalentes como lo son: Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} . Sus inhibidores son el 2-oxoglutarato, NADH y ATP, los cuales actúan competitivamente. La reacción que cataliza es la descarboxilación oxidativa del isocitrato con la formación de 2-oxoglutarato, junto con la reducción de NAD^+ a NADH y la liberación de CO_2 ; esta reacción es irreversible ($\Delta G'^{\circ} = -$

21 KJ/mol). Existen tres isoformas de la enzima: dos dependientes de NADP^+ (ICDH 1 y 2) que son homodímeros (2 subunidades α) y se encuentran en el citosol y en la matriz mitocondrial respectivamente; y una dependiente de NAD^+ (ICDH 3) que se encuentra como heterotetrámero (subunidades 2α , β y γ) en la matriz mitocondrial; también se han reportado heterotetrámeros asociados en pares. Los genes de las subunidades β y γ pueden dar origen a dos y tres productos respectivamente, mediante *splicing* alternativo (NCBI Gene Data Bank). Lo descrito sobre el *splicing* alternativo en la subunidad β es que uno de los productos con 354 aminoácidos se encuentra de manera específica en el tejido muscular (cardíaco y estriado) tiene un pH óptimo de 7.6 y una afinidad por isocitrato de 3.11 mM; en contraparte, el otro producto de β con 349 aminoácidos se ha encontrado en riñón y cerebro, tiene un pH óptimo de 8 y una afinidad por isocitrato de 1.3 mM (Kim, 1999).

2-oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH, EC 1.2.4.2; 2.3.1.61 y 1.8.1.4). Es un complejo multienzimático que consiste de múltiples copias de tres subunidades: la oxoglutarato descarboxilasa dependiente de TPP (E1, EC 1.2.4.2), la enzima núcleo dihidrolipoil succinil-transferasa (E2, EC 2.3.1.614), y la dihidrolipoil deshidrogenasa (LAD, E3 EC 1.8.1.4). Esta última presente también en el complejo de la piruvato deshidrogenasa (cPDH). En particular, la E1, se inactiva por especies reactivas de oxígeno que, en ocasiones ella misma produce. La 2OGDH cataliza la descarboxilación del 2-oxoglutarato en succinil CoA y NADH con un $\Delta G'^{\circ}$ de -33 KJ/mol. Es una enzima altamente regulada, activada por Ca^{2+} , e inhibida por NADH y succinil-CoA (Voet y Voet 1995; Reisch y Elpeleg, 2007; Müller-Esterl, 2008).

Succinil coenzima A sintetasa (SCS, EC 6.2.1.4 y 5). El succinil-CoA es un tioéster de alta energía (su $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis es de -33.5 KJ/mol) que es utilizado por la

enzima SCS para fosforilar un nucleósido difosfato a nivel de sustrato (ADP o GDP); el ΔG° de la reacción es de -2.1 KJ/mol. Existen dos isoformas mitocondriales de este heterodímero (compuesto por subunidades α y β), una isoforma que fosforila ADP (SCS-A, EC 6.2.1.5) y otra GDP (SCS-G, EC 6.2.1.4), su especificidad depende de la subunidad β . La primera isoforma (SCS-A) se expresa en tejidos anabólicos como el hígado y el riñón; y la segunda (SCS-G) isoforma en tejidos catabólicos como los testículos y el cerebro. (Voet y Voet, 1995; Reisch y Elpeleg, 2007; Müller-Esterl, 2008).

Succinato deshidrogenasa (SDH, EC 1.3.5.1). Este complejo enzimático (conocido también como el complejo II, ubiquinona o complejo Q), se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial (subunidades hidrofílicas A y B; subunidades hidrofóbicas C y D), tiene una participación dual, en el ciclo de Krebs y en la cadena transportadora de electrones. En el ciclo, cataliza la reacción de succinato a fumarato (con un ΔG° de 6 KJ/mol) y dona los electrones del $FADH_2$ a las ubiquinonas. (Reisch y Elpeleg, 2007; Müller-Esterl, 2008).

Fumarasa (FH, EC 4.2.1.2). La reacción que cataliza la fumarasa es la conversión de fumarato a malato ($\Delta G^{\circ}=-3.4$ KJ/mol). Existen dos isoformas, una mitocondrial y otra citosólica, ambas son productos del *splicing* alternativo de un solo gen. Se propone que la versión citosólica puede participar en el ciclo de la urea y en el metabolismo de los aminoácidos (Reisch y Elpeleg, 2007; Yogev et al., 2011).

Malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37). La última reacción de la vía consiste en la oxidación del malato a oxaloacetato, este último con acetyl CoA da inicio nuevamente al ciclo. Esta enzima es un homotetrámero y tiene dos isoformas, una mitocondrial y otra

citosólica; ambas forman parte de la lanzadera de malato/aspartato. Por el ΔG° (+ 29.7 KJ/mol) de esta reacción se favorece la reacción en el sentido de la generación de malato (oxaloacetato + NADH \rightarrow malato + NAD⁺) (Reisch y Elpeleg, 2007; Müller-Esterl, 2008).

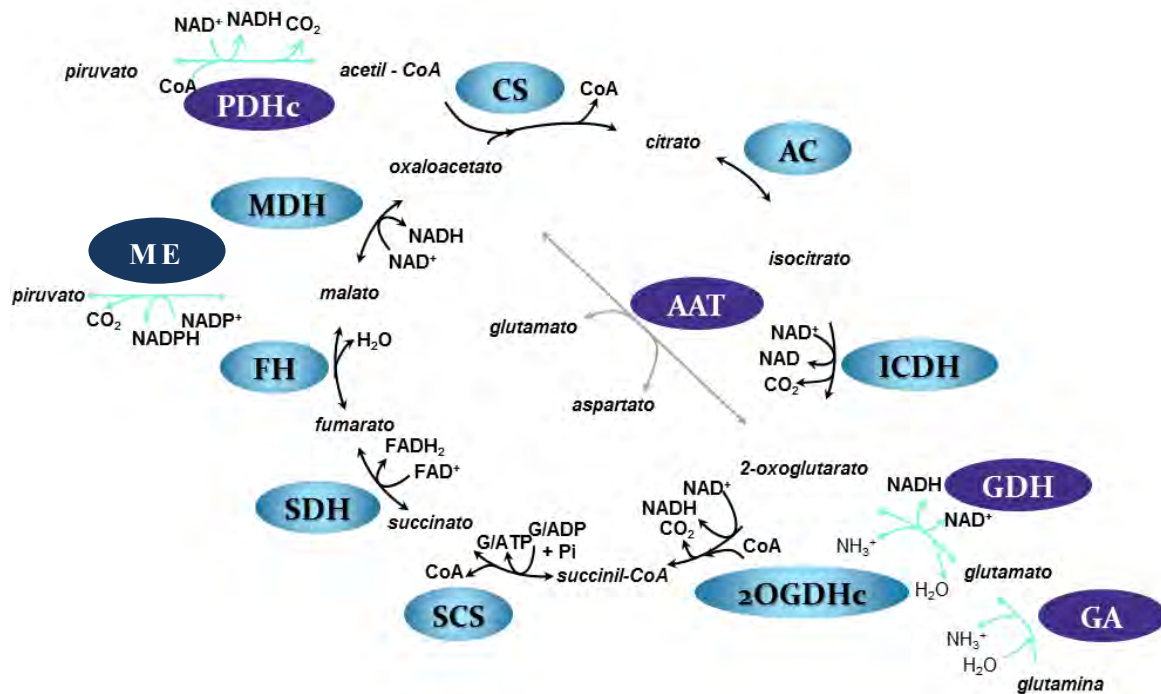


Figura 1. El ciclo de Krebs y enzimas anapleróticas. En azul claro, las enzimas del ciclo de Krebs y en morado las enzimas anapleróticas. CS, citrato sintasa; AC, aconitasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; 2OGDHc, complejo de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa; SCS, succinil coenzima A sintetasa; SDH, succinato deshidrogenasa; FH, fumarasa; MDH, malato deshidrogenasa; cPDH, complejo de la piruvato deshidrogenasa; AAT, aspartato amino transferasa; ME, enzima málica; GA, glutaminasa; GDH, glutamato deshidrogenasa.

Dentro de las enzimas que no son parte del ciclo de Krebs pero alimentan a esta vía con intermediarios (Figura 1, Tabla 2), se encuentran: El complejo de la piruvato deshidrogenasa (cPDH), la enzima málica (ME), la glutamato deshidrogenasa (GDH), la glutaminasa (GA) y la aspartato amino transferasa (AAT)

Piruvato deshidrogenasa (cPDH, EC 1.2.4.1, 2.3.1.12 y 1.8.1.4). Al igual que la 2-oxoglutarato deshidrogenasa es un complejo multienzimático, que cataliza la descarboxilación del piruvato en acetil-CoA ($\Delta G'^{\circ} = -33.5$ KJ/mol). La actividad de este complejo se regula por dos mecanismos: covalente y no covalente. La primera por la fosforilación en tres residuos de serina en la subunidad PDHE1 α (Saunier et al., 2016). Y la no covalente consiste en la inhibición por producto, es decir por el NADH y la AcCoA (Lehninger, et al., 2000).

Enzima málica (ME, EC 1.1.1.38, 39 y 40). Es un homotetrámero que cataliza la reacción de descarboxilación del L-malato a piruvato, con la simultánea reducción de NAD(P)⁺ a NAD(P)H, ($\Delta G'^{\circ} = 57.4$ KJ/mol). Se encuentran tres isoformas, una es citosólica (ME1, c-NADP-ME) y dos son mitocondriales (ME2, m-NAD(P) y ME3, m-NADP-ME). La actividad de estas enzimas puede ser regulada por fumarato (activador) y por ATP (inhibidor) (Hsieh et al., 2015).

Glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2, 3 y 4). Esta enzima es homohexámero que cataliza la desaminación del glutamato en presencia de NAD(P)⁺ con la generación de 2-OG, NH₃ y NAD(P)H, ($\Delta G'^{\circ} = 30$ KJ/mol). Se reportan dos isoformas (GDH1 y GDH2) que se encuentran en la mitocondria y en el núcleo; su actividad se regula por ADP (activador) y por GTP (inhibidor).

Glutaminasa (GA, EC 3.5.1.2). Esta enzima es un dímero que cataliza la conversión de glutamina a glutamato ($\Delta G'^{\circ} = 58 \text{ KJ/mol}$). Existen dos isoformas, la tipo K y la tipo L. La tipo K, que presenta alta afinidad por glutamina, es activada por fosfato e inhibida fuertemente por glutamato, pero no muestra cooperatividad con respecto a la glutamina; mientras que la tipo L tiene baja afinidad por glutamina, es activada por amonio, no es inhibida por glutamato y muestra cooperatividad con respecto a la glutamina (Ralph et al., 2010).

Aspartato amino transferasa (AAT, EC 2.6.1.1). Es una enzima homodimérica que cuenta con dos isoformas, una mitocondrial y una citosólica, AAT 1 y 2, respectivamente (Panteghini, 1990). Esta enzima cataliza la transferencia reversible, del grupo α -amino entre el aspartato y el 2-OG con la producción de glutamato y oxaloacetato, ($\Delta G'^{\circ} = -1.47 \text{ KJ/mol}$) (Alberty RA, 2005).

Tabla 1. Isoformas y estado de oligomerización de las enzimas del ciclo de Krebs.

<i>Enzima</i>	<i>Isoformas</i>	<i>Localización</i>	<i>Estado de oligomerización</i>
Citrato sintasa EC. 2.3.3.1	(CS) No tiene isoformas	Matriz mitocondrial	Homodímero
Aconitasa EC 4.2.1.3	AC (IRP-3)	Matriz mitocondrial	Monómero
	IRP1 (AC1), IRP2 (AC3) (proteína reguladora de hierro-1 y 2)	Citosol	
Isocitrato deshidrogenasa EC 1.1.1.41 y 2	ICDH1 (dependiente de NADP ⁺)	Citosol	Homodímero
	ICDH2 (dependiente de NADP ⁺)	Matriz mitocondrial	Homodímero
	ICDH3 (dependiente de NAD ⁺)		Heterotetrámero y dímero de heterotetrámeros
2-Oxoglutarato deshidrogenasa EC 1.2.4.2; 2.3.1.61 y 1.8.1.4	2OGDHC No tiene isoformas	Matriz mitocondrial	Complejo multienzimático (3 tipos de enzimas y múltiples copias)
Succinil CoA sintetasa EC 6.2.1.4 y 5	SCS-A (dependiente de ATP,4) SCA-G (dependiente de GTP,5)	Matriz mitocondrial	Heterodímero
Succinato deshidrogenasa EC 1.3.5.1	SDH No tiene isoformas	Embebida en la membrana interna mitocondrial	Complejo enzimático (4 subunidades)
Fumarasa EC 4.2.1.2	FH1	Matriz mitocondrial	Homotetrámero
	FH2	Citosol	
Malato deshidrogenasa EC 1.1.1.37	MDH1	Citosol	Homodímero
	MDH2	Matriz mitocondrial	

Voet & Voet, 1995; Reisch y Elpeleg, 2007; Chen y Zheng, 2008; Yogev et al., 2011,

Tabla 2. Isoformas y estado de oligomerización de las enzimas anapleróticas del ciclo de Krebs.

<i>Enzima</i>	<i>Isoformas</i>	<i>Localización</i>	<i>Estado de oligomerización</i>
Complejo de la piruvato deshidrogenasa EC 1.2.4.1, 2.3.1.12 y 1.8.1.4	PDHc	Matriz mitocondrial	Complejo multienzimático (3 tipos de enzimas y múltiples copias)
Enzima málica EC 1.1.1.40, 38 y 39	ME1	Citosol	Homotetrámero, dímero de dímeros
	ME2	Matriz mitocondrial	
	ME3	Matriz mitocondrial	
Glutamato deshidrogenasa EC 1.4.1.2, 3 y 4	GDH1 (NAD ⁺ /NADP ⁺)	Matriz mitocondrial	Homoheptámero, homodímeros funcionales
	GDH2 (NAD ⁺ /NADP ⁺)	Matriz mitocondrial	
Glutaminasa EC 3.5.1.2	Tipo K	Matriz mitocondrial	Dímero
	Tipo L	Matriz mitocondrial	
AAT EC 2.6.1.1	AAT1	Matriz mitocondrial	Dímero
	AAT 2	Citosol	

Panteghini, 1990; Voet y Voet, 1995; Lehninger, 2000; Hsieh et al., 2015; Saunier et al., 2016; Yu et al., 2015.

Enzimas del ciclo de Krebs y su relación con cáncer.

En algunos tipos de cáncer como el renal, de las células papilares y los paragangliomas de cabeza y cuello, se han reportado mutaciones en algunas enzimas del ciclo de Krebs, como la succinato deshidrogenasa (SDH) y la fumarasa (FH) (Pollard, et al, 2003; Turcan, et al., 2012). Estas mutaciones producen una pérdida parcial o completa de la función, lo cual conduce a la acumulación de sus sustratos (succinato y fumarato); los cuales actúan como inhibidores de las prolil-hidroxilasas. Fisiológicamente estas enzimas hidroxilan al HIF-1 α que es ubiquitinado y degradado por el proteosoma; al encontrarse inhibidas se induce la estabilización de HIF-1 α y se genera una pseudo-hipoxia. El factor transcripcional se une a elementos de respuesta a hipoxia, desencadenando el incremento de la glucólisis (Marín-Hernández, et al. 2009).

El ciclo de Krebs tumoral

Aunque el CK proporciona algunos precursores para la síntesis de macromoléculas necesarias para una activa proliferación celular, como ocurre con las tumorales, su estudio en este tipo células no se había llevado a cabo debido a que diversos grupos de investigación consideraron que no era funcional (Parlo y Coleman, 1984; Baggeto, 1992; Cardaci y Ciriolo, 2012). Esta suposición se apoyó en las siguientes evidencias experimentales: 1) la mayor parte del piruvato proveniente de la glucólisis es desviado hacia la producción de lactato (y no entra al CK) debido a que la PDH es inhibida por acetoína (Baggeto, 1992; 2) una elevada expulsión de citrato de la mitocondria al citosol

(en el hepatoma de Morris 3924 es 4 veces más rápida la expulsión de citrato que el hígado de rata) (Parlo y Coleman, 1984) y 3) mutaciones en algunas de las enzimas del ciclo (SDH, FH e ICDH 1 y 2) que producen enzimas inactivas o con preferencia por otro sustrato (Cardaci y Ciriolo, 2012). Sin embargo, en otros modelos de células tumorales (Hepatocarcinomas AS-30D y Erlich-Letree) se demostró que el ciclo de Krebs es funcional (Dietzen y Davis, 1993; Lazo y Sols, 1980). Aunque no se conoce si en las mitocondrias tumorales se expresan isoformas específicas de las enzimas del ciclo de Krebs, como se ha descrito para la glucólisis tumoral, se ha observado un incremento significativo (de 2 a 5 y hasta 20 veces) en las velocidades máximas (V_m) en la mayoría de las enzimas de la vía (Dietzen y Davis, 1993; Del Mazo-Monsalvo, 2014) que se asocia con el incremento en el flujo de la vía, de hasta 4 veces, en mitocondrias aisladas de células tumorales AS-30D, con respecto a mitocondrias de hígado de rata (RLM) (Dietzen y Davis, 1993). El incremento en el flujo del CK en las células tumorales se puede atribuir al incremento en la actividad de la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH), que se sabe limitan el flujo del CK en células no tumorales (Lehninger et al., 2000). A esto se suman las diferencias en la sensibilidad a activadores/inhibidores de estas enzimas, por ejemplo, en las células tumorales AS-30D se reporta que la NAD^+ -ICDH se inhibe totalmente por NADH 100 μM vs RLM (Murphy et al., 1988).

Adicionalmente a los cambios reportados en el ciclo de Krebs, algunas de las enzimas que proporcionan intermediarios a esta vía (enzimas anapleróticas) presentan algunos cambios, por ejemplo, la glutamina es el sustrato que las células tumorales oxidan

preferentemente (Dietzen y Davis, 1993; Dang, 2010). La glutamina es desaminada a glutamato por la glutaminasa, el glutamato puede ser desaminado nuevamente por la glutamato deshidrogenasa a 2-oxoglutarato, o el glutamato (junto con el aspartato) es transaminado por la aspartato aminotransferasa (AAT) a 2-oxoglutarato u oxaloacetato, (Baggeto, 1992). La vía de glutaminólisis se encuentra incrementada por varios factores, entre ellos, el transportador de glutamina incrementa su velocidad de 4 a 10 veces. Asimismo, la glutaminasa incrementa su actividad hasta 10 veces y se reportan cambios en la expresión de las isoformas de la glutaminasa, aumenta el contenido de GLS1 (isoforma de riñón, tipo K) que es activada por fosfato y disminuye el contenido de GLS2 (isoforma de hígado, tipo L) (Yu et al., 2015).

Otra diferencia importante es la presencia de la enzima málica mitocondrial, cuya actividad se encuentra de 10 a 20 veces más activa en el tumor en comparación con su tejido de origen (Lenta y Riehl, 1949). Así mismo se ha reportado que el AMP activa ($K_{0.5} = 40 \mu\text{M}$) al complejo de la PDH en el hepatocarcinoma de Ehrlich-Lette pero no al complejo de hígado de rata (Lazo y Sols, 1980).

Además, la membrana externa mitocondrial tumoral contiene más colesterol respecto a las membranas de mitocondrias no tumorales (Baggeto, 1992). El colesterol rigidiza la membrana, lo que la hace menos permeable, permitiendo la acumulación de iones, algunos de estos como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} que son activadores muy potentes de la ICDH y la 2OGDH, (Dietzen y Davis, 1993). Esto sugiere que ambas enzimas pueden ser muy activas y no limitar el flujo del ciclo, como ocurre en células normales (en las cuales son importantes sitios de control del flujo).

Si las enzimas limitantes del CK en las células tumorales son distintas a las enzimas de células no tumorales, entonces el control del flujo también será diferente, de tal forma que establecer cuáles son los principales sitios de control en el ciclo de Krebs tumoral permitirá proponer nuevos sitios terapéuticos. Las enzimas que ejercen control podrían ser consideradas blancos terapéuticos, debido a que una reducción en su actividad puede producir una disminución en el flujo de la vía (Moreno-Sánchez et al., 2005; 2007). Para lograr esto, una estrategia es la construcción de un modelo cinético a partir de los parámetros cinéticos (K_m , V_m) de cada una de las enzimas que componen la vía metabólica. Como primer paso en la construcción del modelo del ciclo de Krebs, en mi tesis de licenciatura comencé con la caracterización de las enzimas de esta vía en mitocondrias tumorales y no tumorales. Ahora, el análisis se enfocó, principalmente en la determinación de la respuesta a activadores e inhibidores fisiológicos de las enzimas de esta vía (NAD^+ -ICDH y 2-OGDH), así como en la determinación de los parámetros cinéticos de las principales enzimas anapleróticas (cPDH, ME, GDH, AAT y GA), cuyas reacciones alimentan el CK con intermediarios. A partir de los valores de los parámetros cinéticos se determinaron las eficiencias catalíticas (V_m/K_m) y con base en la eficiencia catalítica, se hizo la predicción de las enzimas que podrían controlar el flujo de la vía.

HIPÓTESIS

Las enzimas del ciclo de Krebs tumoral presentan cambios en sus parámetros cinéticos (V_m , K_m , V_m/K_m) y en la respuesta a sus moduladores (activadores e inhibidores). Por lo tanto, las enzimas que limitan el flujo del ciclo de Krebs tumoral serán diferentes a las enzimas que limitan el flujo en las células no tumorales.

OBJETIVOS

GENERAL

- Caracterización cinética del ciclo de Krebs tumoral y de las principales enzimas anapleróticas.

PARTICULARES

- Determinar los parámetros cinéticos (V_m , K_m y V_m/K_m) de las enzimas del ciclo de Krebs (AC, NAD^+ -ICDH, 2OGDH) y de las principales enzimas anapleróticas (cPDH, ME, GDH, TGO y GA) en mitocondrias aisladas de AS-30D y de hígado de rata.
- Determinar el efecto de los activadores (MgCl_2 , y ADP) e inhibidores (ATP, NADH) sobre la actividad de la NAD^+ -ICDH y de la 2-OGDH.
- Determinar y comparar las eficiencias catalíticas (V_m/K_m) de las enzimas del ciclo de Krebs y de las enzimas anapleróticas.

ANTECEDENTES

Con el propósito de establecer cualitativamente una posible diferencia en la distribución de control de flujo en el CK, se realizó la caracterización cinética de la mayoría de las enzimas de la vía (CS, AC, ICDH, 2-OGDH, MDH, succinato deshidrogenasa y fumarasa) bajo las mismas condiciones de pH y temperatura y se encontró que las velocidades máximas (V_m) fueron significativamente mayores en las mitocondrias tumorales (1.8-5 y hasta 20 veces) respecto a las mitocondrias de hígado de rata, pero las afinidades (K_m) por cada uno de sus sustratos fueron muy parecidas en ambos tipos de mitocondrias y similares a las reportadas en la literatura (Del Mazo-Monsalvo, 2014). A partir del cálculo de las eficiencias catalíticas (V_m/K_m) se determinó que las enzimas de la vía menos eficientes fueron la MDH, la ICDH y la 2-OGDH en ambos tipos de mitocondrias, lo que sugería que no habría diferencia en la distribución de control (Del Mazo-Monsalvo, 2014). Sin embargo, esta aproximación experimental no contempló las concentraciones fisiológicas de sustratos, productos, inhibidores y activadores que pueden modificar la actividad de las enzimas, sobre todo la concentración de los activadores (Ca^{2+} y Mg^{2+}) de la ICDH y de la 2-OGDH. Lo anterior sugiere que ambas enzimas pueden ser muy activas y no limitar el flujo del ciclo en las células tumorales, por lo tanto la distribución del control del flujo podría ser diferente entre las células tumorales y no tumorales.

Adicionalmente, en este primer estudio faltó caracterizar a otras enzimas que estrictamente no son parte del ciclo de Krebs pero aportan intermediarios y que podrían controlar el flujo del ciclo, como la enzima málica (ME), la piruvato deshidrogenasa

(PDH), la glutamato deshidrogenasa (GDH), la aspartato amino transferasa (AAT) y la glutaminasa (GLS) (Moreadith y Fiskum, 1984). Particularmente las tres últimas enzimas participan en la oxidación de glutamina, que es el sustrato que preferentemente consumen las células tumorales (Baggeto, 1992; Rodríguez-Enríquez, et al., 2000).

Por lo anterior, en este proyecto se propone la caracterización cinética de las enzimas mencionadas. A partir de estos resultados se podrá construir un modelo cinético de la vía que explique los mecanismos de regulación y control del CK tumoral y predecir los posibles sitios de control de flujo.

METODOLOGÍA

Línea tumoral AS-30D

La línea tumoral utilizada como modelo experimental AS-30D, es un hepatocarcinoma ascítico de rata. Tiene como origen hígado de rata transformado por medio de la administración oral de 3'-metil-4-dimetilaminoazobenceno (0.06% w/w) (Smith et al., 1970). Esta línea pertenece a las células tumorales de rápido crecimiento, conforme a la clasificación de Pedersen (1978). Tiene como principales características, glucólisis aeróbica incrementada, acrecentada síntesis de lípidos y colesterol, así como una velocidad elevada en el consumo de glutamato y glutamina (Greenhouse et al., 1976; Pedersen, 1978; Nakashima et al., 1984; Briscoe et al., 1994; Kelleher et al., 1987).

Aislamiento de mitocondrias

Se aislaron mitocondrias de hígado de rata y de hepatoma ascítico AS-30D de acuerdo con las técnicas reportadas por Moreno-Sánchez et al. (1985) y Moreadith (1984) las cuales se describen a continuación.

Células AS-30D

La línea celular AS-30D se propagó por inoculación de 3 a 4 mL de líquido ascítico, vía intraperitoneal a ratas hembra de la cepa *Wistar* (200-250 g de peso). Las ratas se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* de 5 a 8 días. Posteriormente, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el líquido de ascitis (25 – 50 mL). Éste se centrifugó a 1800 rpm durante 2 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante, el botón se resuspendió en 30 mL de buffer NKT (NaCl 150 mM, KCl 5 mM y Tris/HCl 10 mM, pH

7.4) (para lisar los eritrocitos presentes) y se centrifugó a 1800 rpm por 3 minutos a 4°C. Al término se descartó el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el botón celular en buffer NKT. El proceso de lavado se repitió hasta obtener el botón celular libre de eritrocitos, para ello se disminuyó entre cada lavado la velocidad de centrifugación (100 rpm), teniendo como límite de velocidad 800 rpm. Posteriormente, el botón se resuspendió en buffer SHE (Sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM y EGTA 1 mM, pH 7.4), se determinó la proteína celular (por el método de Biuret, conforme a Gornall et al. 1949, utilizando un estándar de albúmina sérica bovina) y se ajustó la suspensión celular a una concentración de 30 mg/mL. Con agitación continua y en presencia de albúmina sérica bovina al 0.4%, se agregó gota a gota digitonina (10 µg/mg de proteína celular). Se incubó la suspensión por tres minutos a 4°C. Pasado este tiempo, se adicionó SHE (20 mL) y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el botón y se homogenizó (con un homogenizador de tejidos de émbolo tubo de vidrio, con una separación de 0.2 mm). El homogenizado se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante resultante se reservó, el botón se resuspendió y se homogenizó nuevamente; este proceso se repitió al menos 3 veces o hasta que el botón resultante fuera totalmente blanquecino. Los sobrenadantes se centrifugaron primero a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C (para eliminar los restos celulares) y posteriormente, al pasarlos a tubos limpios, se centrifugaron a 9500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los botones se resuspendieron con 500 µL de SHE, se colocaron en un único tubo y se incubaron 10 minutos con ADP 1 mM y albúmina deslipidada al 0.1%. Al término de este tiempo se adicionó SHE (30 ml), y se centrifugó a 9800 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El botón de mitocondrias se resuspendió en 30 mL de SHE y se centrifugó a 9800 rpm durante 10

minutos a 4 °C, este proceso se repitió dos veces más (para evitar la contaminación del citosol). Finalmente, el botón se resuspendió en 1 mL de SHE y se determinó la concentración de proteína por el método de Biuret.

Hígado de rata

A una rata hembra (cepa *Wistar*, 200-250 g) se le extrajo el hígado, se colocó en SHE y se cortó en trozos pequeños. Éstos se homogenizaron (con un homogenizador de tejidos de émbolo tubo de vidrio, con una separación de 0.2 mm) y la suspensión se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se filtró con una gasa humedecida con SHE. Posteriormente el sobrenadante (ya filtrado) se centrifugó a 9500 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se retiró y el botón se resuspendió en 1 mL de SHE; se incubó 10 minutos con ADP 1 mM y albúmina deslipidada al 0.1%. Una vez transcurrido este tiempo, las mitocondrias se resuspendieron en 30 mL de SHE y se centrifugaron a 9800 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se retiró y el botón mitocondrial se resuspendió nuevamente en 30 mL de SHE y se centrifugó. Este procedimiento se repitió dos veces más, como se mencionó, para evitar la contaminación citosólica. Finalmente, el botón mitocondrial se resuspendió en 1 mL de SHE y se determinó el contenido de proteína por el método de Biuret.

Determinación de actividades enzimáticas y parámetros cinéticos

Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Agilent 8453), en celdas de polimetacrilato con paso de luz de 1 cm y 1 mL de capacidad, en medio HKE (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) a 37°C. Las mitocondrias se

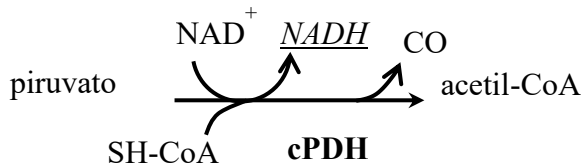
permeabilizaron con tritón al 0.02%. La mayoría de los ensayos se acoplaron a reacciones que consumían o generaban NAD(P)H, que absorbe a una longitud de onda de 340 nm y tiene un coeficiente de extinción molar de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Rogers y Gibon, 2009). Para evitar el consumo del NADH por el complejo I (NADH deshidrogenasa) se agregó rotenona $5 \mu\text{M}$. La sensibilidad de detección del método es de 0.6 nmol de NAD(P)H.

Para cada ensayo: a) se determinó el intervalo de concentración de proteína en el cual, la actividad es proporcional a la cantidad de proteína. Es decir, al ensayar con el doble o con la mitad de proteína, se obtuvo la mitad o el doble de la actividad; b) y se determinó que la reacción era específica para los sustratos ensayados, ya que en ausencia de alguno no se observó actividad.

Los parámetros cinéticos se obtuvieron al ajustar los valores de velocidad a las ecuaciones de Michaelis-Menten, inhibición competitiva simple, inhibición no competitiva simple o la ecuación de Monod-Wyman y Changeux de enlazamiento exclusivo. Esto se realizó con el programa Origin 5.

El complejo de la piruvato deshidrogenasa

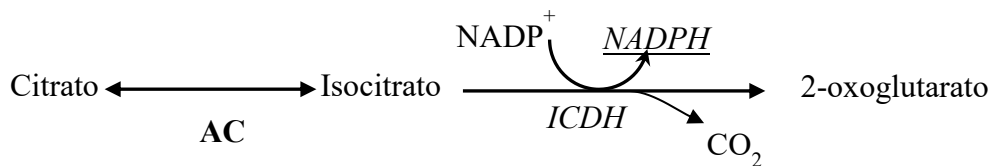
Reacción:



La actividad se determinó en 1 mL de HKE con NAD^+ (0.1 - 10 mM), piruvato fresco (0.03 - 12 mM), TPP (1 mM), DTT (1 mM) y 0.01 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició con CoA fresca (0.005 - 0.4 mM). Para la determinación de los valores de K_m para alguno de los sustratos (piruvato, NAD^+ o CoA) se mantuvo saturante la concentración del resto de los sustratos (piruvato 4 mM, NAD^+ 3 mM, o CoA 0.1 mM).

Aconitasa

Reacción y sistema acoplante:

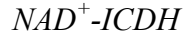
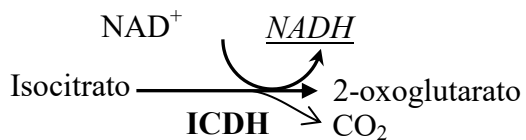


Debido a que esta enzima es sumamente sensible al oxígeno (estrés oxidativo), a las mitocondrias aisladas se les adicionó 1 mM de DTT. El medio de reacción (HKE) se burbujeó con nitrógeno por al menos 30 minutos, y el ensayo se realizó en una atmósfera microaerofílica (condición de mezcla de gases: 80% nitrógeno, 15% dióxido de carbono y 5% de helio, con un nivel de oxígeno que no superó 1 ppm) dentro de una cámara de

anaerobiosis (modelo COY Laboratory products Inc., Michigan, USA). La reacción *forward* (citrato a isocitrato) se determinó en presencia de isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ (1 U), MgCl_2 (0.5 - 2 mM) y 0.15 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició con la adición de citrato (0.4-6 mM).

Isocitrato deshidrogenasa

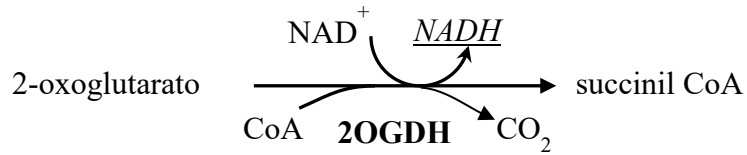
Reacción:



En un volumen final de 1 mL de HKE. Se añadió 0.1 mg de proteína mitocondrial, NAD^+ (0.015 - 3 mM) y MgCl_2 (0 - 2 mM) o MnCl_2 (1 mM); con y sin ADP 1 mM. La reacción se inició con la adición de DL-isocitrato (0.1 - 8 mM, concentración basada en el contenido de L-isocitrato). Cuando se determinó la K_m por NAD^+ se mantuvo fija la concentración de isocitrato (6 mM), mientras que la de NAD^+ (2.5 mM) cuando se determinó la K_m por L-Isocitrato.

2-oxoglutarato deshidrogenasa

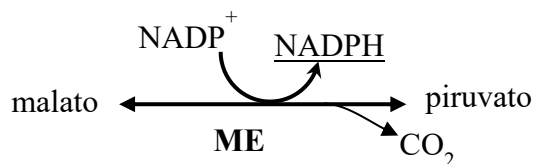
Reacción:



La actividad de la enzima se ensayó en presencia de 2-oxoglutarato (0.75 - 15 mM), coenzima A (0.025 - 1 mM), NAD^+ (0.15mM - 2 mM), MgCl_2 (0 - 2 mM), TPP^1 (1 mM) y DTT (1 mM). Se utilizaron de 0.2 a 0.25 mg de proteína mitocondrial, la mezcla se incubó por 4 min, y se inició la reacción con la coenzima A. Al determinar los valores de K_m de alguno de los sustratos (2-oxoglutarato, NAD^+ o CoA) se mantuvo fija la concentración del resto de los sustratos (2-oxoglutarato 10 mM; NAD^+ 1 mM; o CoA 0.5 mM).

Enzima málica

Reacción:



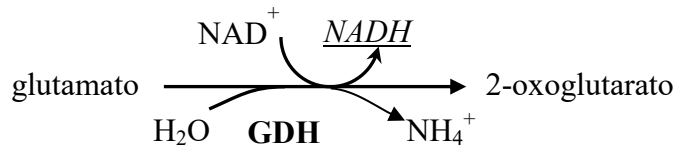
En la mezcla de reacción para cuantificar la actividad de la enzima en el sentido de la generación de piruvato contenía 0.2 mg de mitocondrias y NADP^+ (1 - 25 mM). La

¹ La coenzima pirofosfato de tiamina (TTP, en inglés cocarboxilasa es la forma activa de la tiamina (vitamina B1). Esta coenzima forma parte integral del sitio reactivo de la 2-OGDH y de la PDH (Hawkins, et al., 1989).

reacción se inició con la adición del malato (1 - 15 mM). Para determinar la K_m por el NADP^+ , la concentración de malato utilizada fue 10 mM, mientras que cuando se determinó la K_m por malato la concentración de NADP^+ fue de 1.5 mM. El efecto de activación por MgCl_2 (0 - 5mM) y fumarato (3 - 9 mM) se determinó con respecto a ambos sustratos. Dado que esta enzima no se encuentra en mitocondrias de hígado, se comparó con la presente en corazón de rata.

Glutamato deshidrogenasa (GDH)

Reacción:



Para determinar los parámetros cinéticos en la reacción *forward* de esta enzima, el medio de reacción contenía glutamato (0.1 - 25 mM) y 5-10 μg de proteína mitocondrial. La reacción se inició con NAD^+ (0.25 - 10 mM). En la reacción *reverse* se utilizó NH_4^+ (5 - 120 mM), NADH (0.02 - 0.15 mM), 0.2 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició con 2-oxoglutarato (0.1 - 2.5 mM). Se evaluó el efecto de activadores como el MgCl_2 (2 mM) y el ADP (1 mM, con 2 mM de MgCl_2) con respecto a los dos sustratos de la enzima, glutamato (0.025 - 25 mM) y NAD^+ (2 mM).

Glutaminasa (GA)

Reacción:



Para determinar la actividad de la glutaminasa, a 200 μL de medio SHE se le adicionó glutamina 70 mM y Tritón X-100 al 0.02%. Cuando fue necesario se usó fosfato (100 mM) o amonio (3.5 mM). Esta mezcla se incubó a 37°C. La reacción se inició con la adición de 0.22 mg de proteína mitocondrial y se paró a los 10 minutos, adicionando 20 μL de PCA (30%) y EDTA (10 mM). El extracto se neutralizó con KOH (3M), TRIS (0.1M). El glutamato generado por la actividad de la glutaminasa se determinó mediante la formación de NADH por acción de la glutamato deshidrogenasa. Para ello se colocaron 100 μL de extracto a 2 mL buffer Tris (50mM), Hidracina (400 mM) a pH 9 que contenía: NAD^+ 1 mM, ADP 2 mM, MgCl_2 3 mM, y GDH 1.5 U/mL.

Aspartato amino transferasa (AAT).

Reacción:



La actividad de esta enzima se ensayó en presencia de aspartato (0.1-20 mM), NADH 0.15 mM, malato deshidrogenasa 1 U y 0.04-0.08 mg de proteína. Con la adición de 2-oxoglutarato (0.05-10 mM) se arrancó la reacción. Cuando se determinaron los valores de K_m por el aspartato o el 2-oxoglutarato el otro sustrato se mantuvo saturante (2-oxoglutarato 10 mM o aspartato 10 mM).

Determinación de metabolitos

Contenido total de magnesio y manganeso

La concentración de magnesio y manganeso se determinó a través de espectrofotometría de absorción atómica (EAA), en un equipo Varian Spectra AA 644, utilizando una mezcla de aire/acetileno con un flujo de 13.5/4.5 L/min. Para ello, 0.5 mg de proteína mitocondrial se mezclaron con 1 mL de una solución de H₂SO₄ y de HNO₃ (3:1). Posteriormente las muestras se incubaron a 90°C durante 12 - 24 hrs (hasta eliminar la materia orgánica) en un digestor analógico. En las muestras se determinó el contenido de cada metal con la ayuda de una curva de calibración que tuvo un intervalo de 0.5 a 4 ppm de los metales (estándares comerciales para EAA).

Contenido de Mg²⁺ libre en la matriz mitocondrial

Las mitocondrias se cargaron con 5 μM Mag-Fura-2, se incubaron 30 - 40 mg de mitocondrias en 2 mL de medio SHE y el Mag-Fura-2 por 20 minutos. Al término de la incubación, las mitocondrias se diluyeron con medio SHE frío y se centrifugaron a 9800 rpm por 10 min, el botón se resuspendió en un 1 mL de SHE. Posteriormente, 0.5 mg de mitocondrias cargadas con el indicador se incubaron en medio KME (que contenía succinato 5 mM y rotenona 4 μM) en agitación suave a 30°C y en una celda gaseada con oxígeno. Los cambios de fluorescencia se monitorearon en un espectrofluorómetro Aminco Bowman Serie 2. Las longitudes de onda de excitación fueron 340 y 398 nm y la emisión se recogió a 483 nm. La concentración de Mg²⁺ libre en la matriz mitocondrial ($[Mg^{2+}]_m$) se determinó a partir de la señal de la relación de fluorescencia a 398/340 nm (R). R_{max} y R

R_{min} se obtuvieron al final de cada experimento. R_{min} se obtuvo por la adición de 800 pmol de A23187/mg de proteína y suficiente EDTA-Tris, pH 8,0, para quelar todo el Mg^{2+} presente en el medio de incubación y se añadió Triton X-100 al 0.0075% (v / v) para asegurar que el Mg^{2+} se equilibrara través de la membrana. Mientras, que R_{max} se obtuvo después de la adición de $MgCl_2$ 70 mM. El cálculo de $[Mg^{2+}]_m$ se realizó usando la siguiente ecuación:

$$[Mg^{2+}] = K_{d(Mg^{2+})} \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} * \frac{S_f}{S_b} \right)$$

Donde $K_{d(Mg^{2+})}$ es la constante de disociación para el complejo Mg-indicador en la matriz mitocondrial y S_f y S_b son las intensidades de fluorescencia del indicador a 398 nm con cero y exceso de Mg^{2+} , respectivamente. El valor de K_d utilizado fue de 1.52 mM (Rodríguez-Zavala y Moreno-Sánchez, 1998).

Determinación de intermediarios del ciclo de Krebs.

Las mitocondrias (5 mg) se colocaron en un tubo con 1 mL de PCA al 3% (v/v) y la mezcla se agitó vigorosamente. Posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante. Éste se neutralizó con KOH (3M) y Tris (0.1 M) y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. El sobrenadante se guardó a -72 °C. Las concentraciones de isocitrato, de 2-oxoglutarato y de NAD^+ se determinaron por medio de ensayos enzimáticos acoplados a la generación o consumo de NADH en el medio HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y pH 7.4, de acuerdo a los ensayos reportados en la literatura (Bergmeyer, 1983).

RESULTADOS

En todos los ensayos de actividad se emplearon mitocondrias que fueron lavadas tres veces con medio SHE, para eliminar la contaminación citosólica, con lo cual se evitó la actividad de interferencia provocada por las isoformas citosólicas de enzimas mitocondriales (AC, TGO, ME), así como de la LDH que interfirió en el ensayo de la PDH. Con los lavados la actividad contaminante en las mitocondrias de LDH (marcador citosólico) fue reducida alrededor de 90% en mitocondrias de hígado y un 80% en mitocondrias de AS-30D% (vs mitocondrias no lavadas de hígado y AS-30D); mientras que el control positivo (CS, marcador de mitocondria) se mantuvo similar.

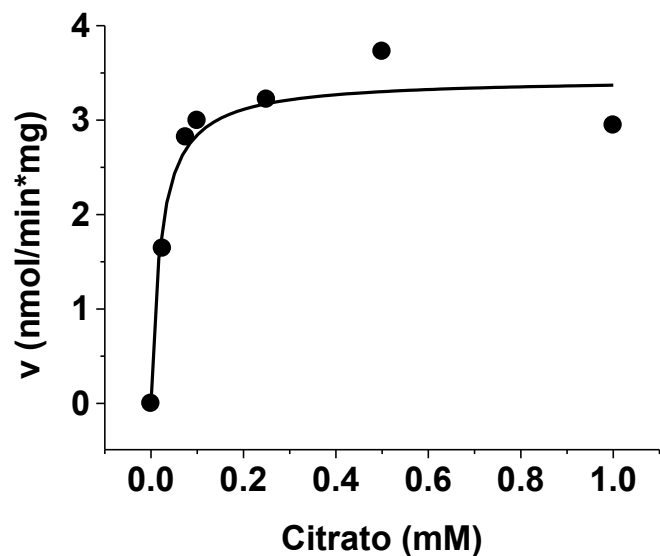
Aconitasa (AC)

En los ensayos para medir la actividad de esta enzima se hicieron en una condición microaerofílica (alrededor de 1 ppm de O₂) para evitar que la actividad de la enzima se modificará por la presencia de oxígeno.

En ausencia de MgCl₂, la enzima de hígado y la de AS-30D no tuvieron actividad. La concentración óptima de este metal fue de 1 mM, con la que se obtuvo una V_m de 12.5 nmoles/min*mg (n=2) y una K_m por citrato de 0.26 mM (n=2) para la enzima de AS-30D. Mientras que para la enzima de hígado, los valores fueron de 4 nmoles/min*mg de proteína (n=1) y 0.1 mM (n=1), respectivamente (Fig. 2.).

Otros metales, como el MnCl₂ (1 mM) y el FeCl₂ (80 μM) mostraron ser mejores activadores que el MgCl₂, pero a concentraciones que no se encuentran fisiológicamente en la matriz mitocondrial.

A)



B)

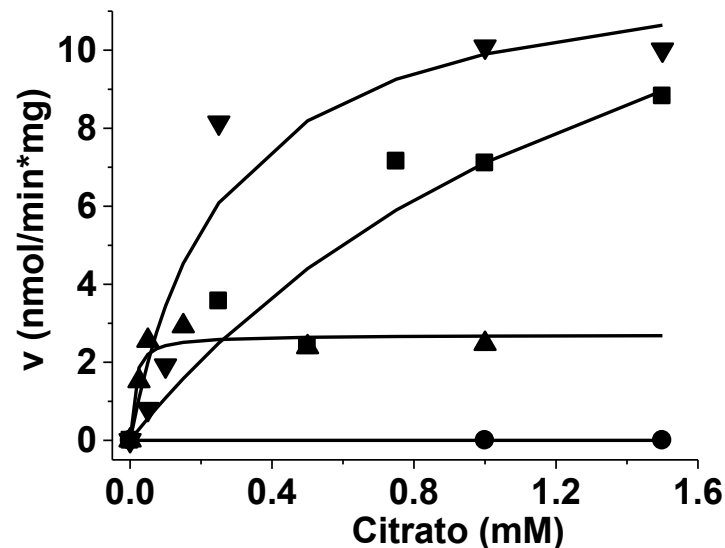


Figura 2. Cinética de activación de la aconitasa de hígado y de AS-30D por MgCl₂. A) Parámetros cinéticos de la AC de hígado en la condición de 2 mM de MgCl₂. B) Familia de curvas en las que se observa la activación de la aconitasa de AS-30D por MgCl₂; las concentraciones de MgCl₂ empleadas fueron 0 (●), 0.5 (■), 1 (▼) y 2 (▲) mM. En (0 mM, ●) se observa que el activador es esencial ya que en su ausencia no hay actividad, en 0.5 mM (■) y 1 mM (▼) la V_m incrementa a la par de la afinidad (hasta 12 nmol/min*mg y 0.8-0.24 mM, respectivamente), en 2mM la V_m disminuye (a 3 nmol/min*mg) y la afinidad aumenta (hasta 0.2 mM); parámetros similares a los obtenidos en RLM en la misma condición (V_m 3.44 nmol/min*mg y K_m 0.021 mM).

Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+

En cuanto a la NAD^+ -ICDH, previamente se determinó que el mejor activador era el manganeso (2 mM) (Del Mazo-Monsalvo, 2014.), que incrementó la V_m y la afinidad en ambos tipos de mitocondrias, con respecto al efecto del magnesio (2 mM) a pesar de no ser el activador fisiológico.

Cabe resaltar que con MnCl_2 se observaron diferencias en el comportamiento de la enzima de AS30D con respecto a la enzima de las mitocondrias de hígado de rata, en relación a la afinidad por el isocitrato. La enzima tumoral mostró una cinética sigmoideal con una n de 2.55 ± 0.04 (que indica cooperatividad entre más de los dos sitios catalíticos encontrados en un heterotetrámero, lo que sugiere un arreglo dimérico de éstos) y una $K_{0.5}$ de 0.64 mM ($n=2$); mientras que la enzima de hígado presentó una cinética hiperbólica ($K_m = 0.13$ mM; $n=2$) (Figuras 3A y 3B). Pero la enzima de AS-30D (95 nmol/min*mg, $n=2$) presentó una V_m 2.4 veces mayor con respecto a la enzima de hígado (28 nmol/min*mg, $n=2$).

En presencia de MgCl_2 (2 mM), ambas enzimas mostraron una cinética sigmoideal. Con respecto a la V_m , se observó la disminución en el valor de ésta, cercana al 50% en hígado y al 40% en AS-30D, respectivamente; comparando el efecto del MnCl_2 (2 mM) con el MgCl_2 (2 mM). Sin embargo, a pesar de esta disminución, la actividad de la enzima en AS-30D (37 ± 3 , $n=3$) fue 2.8 veces mayor en comparación con la enzima de hígado (13.2 ± 3.6 , $n=3$). Estos resultados indicaron que el Mn^{2+} es un activador más potente que el Mg^{2+} (Figura 3). Los valores de la $K_{0.5}$ y el de n se determinaron al ajustar los datos a la ecuación de Hill y ambos parámetros fueron similares para la enzima de hígado ($K_{0.5} = 1.38$

± 0.22 mM y $n = 2.53 \pm 0.14$; $n=3$) y para la enzima de AS-30D ($K_{0.5} = 1.4 \pm 0.11$ y $n = 2.9 \pm 0.24$; $n=3$). Asimismo, valores similares de n se calcularon para las enzimas de hígado (1.93 ± 0.5 , $n=3$) y AS-30D (2.33 ± 0.33 , $n=3$), a partir de los regráficos de doble recíprocos al corregir $1/S$ por $1/S^n$ siendo $n > 1$ y manteniendo R (coeficiente de determinación) lo más cercana a 1 (Figuras 3C y 3D).

Al incrementar la concentración de magnesio de 0.5 a 2 mM (Figura 4), la velocidad de la NAD^+ -ICDH de hígado y de AS-30D aumentó alrededor de 3 veces, pero sólo en la enzima de AS-30D la afinidad por el isocitrato aumentó 3 veces (Figura 4).

En la condición en que no fue añadido magnesio (MgCl_2 0 mM) en las mitocondrias de hígado, no se detectó actividad de la NAD^+ -ICDH. En esta misma condición la enzima de AS-30D tuvo una actividad baja (2 ± 1.6 nmol/min*mg de proteína, $n=3$) (Figura 4). Sin embargo al realizar el ensayo con EDTA (2.5 mM) la actividad de la enzima no fue detectada. Por lo que la actividad observada se atribuyó a la enzima dependiente de NADP^+ (isoforma mitocondrial), debido a que el NAD^+ utilizado durante los ensayos contenía trazas de NADP^+ (aproximadamente del 1%). Esta isoforma también es dependiente de Mg^{2+} y se activa a menores concentraciones (desde 0.1 mM) que la dependiente de NAD^+ .

Posteriormente, se determinó el efecto del ADP (1 mM) en la actividad de la enzima en presencia de MgCl_2 (2 mM). El ADP incrementó la V_m y la afinidad de la enzima por isocitrato con respecto a solo Mg^{2+} . En la enzima de hígado, el ADP volvió hiperbólica la cinética respecto al isocitrato (coeficiente de Hill, $n \sim 1$); mientras que en AS-30D se mantuvo sigmoidal (n de 1.7 a 1.99).

También se determinó el efecto del NADH y el ATP, inhibidores clásicos y fisiológicos de esta enzima; junto con los activadores Mg^{2+} y ADP, en las condiciones: $MgCl_2$ y $MgCl_2 + ADP$. La inhibición por NADH con respecto al NAD^+ (subsaturante) fue similar en la enzima de hígado y de AS-30D, alrededor del 50% con 40 μM en presencia de Mg^{2+} y $Mg^{2+} + ADP$ (Figuras 5A y 5C). La inhibición por NADH con respecto a isocitrato (subsaturante) fue mayor al 50% entre 80 y 140 μM de NADH en la enzima de AS-30D incluso en la condición de $MgCl_2 + ADP$, mientras que la enzima de hígado solo se inhibió un 50% (condición de $MgCl_2$; Figura 5B) o no fue inhibida y en su lugar fue activada (condición de $MgCl_2 + ADP$; Figura 5D). Un resultado similar se obtuvo con ATP como inhibidor. La inhibición con respecto al NAD^+ (subsaturante) no mostró diferencias entre la enzima de hígado y la de AS-30D; mientras que con respecto al isocitrato (subsaturante) la enzima tumoral mostró una inhibición mayor al 50% con ATP 1 mM en presencia de $Mg^{2+} + ADP$ (Figura 6).

Sin embargo, al determinar la K_i por NADH con respecto al NAD^+ (Figuras 7A y 7B) o con respecto al isocitrato (Figuras 7C y 7D), no se observó una diferencia significativa entre los valores de K_i para ambas enzimas (Tabla 3), así como en el resto de los parámetros cinéticos (K_m , n , L). Solo el valor de la V_m de la enzima de AS-30D fue 3 veces mayor con respecto a la enzima de hígado (Tabla 3). Cabe señalar que para obtener los valores de K_i (con respecto a isocitrato) los datos se ajustaron a la ecuación de Monod-Wyman y Changeux de enlazamiento exclusivo para inhibición de enzimas cooperativas (Figuras 7C y 7D). Mientras que con respecto a NAD^+ , la K_i se determinó al ajustar los valores a la ecuación de inhibición competitiva simple (en el caso de la enzima de AS-30D) o no competitiva (en el caso de la enzima de hígado) (Figuras 7A y 7B).

Por otra parte, se evaluó el efecto del calcio ($100 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre), otro activador de la ICDH. El calcio activó a la enzima de AS-30D entre un 30 a 50% ($n= 1$) en presencia de 1 y 2 mM de MgCl_2 , respectivamente, con isocitrato subsaturante (1.5 mM), en contraste, la enzima de hígado no se activó ($n=1$). Ambas enzimas fueron activadas hasta un 90%, con 1 y 2 mM de MgCl_2 , cuando el NAD^+ se encontraba a una concentración subsaturante (0.3 mM). Cabe señalar que el calcio sólo activó a las enzimas cuando el magnesio se encontraba en el medio de reacción.

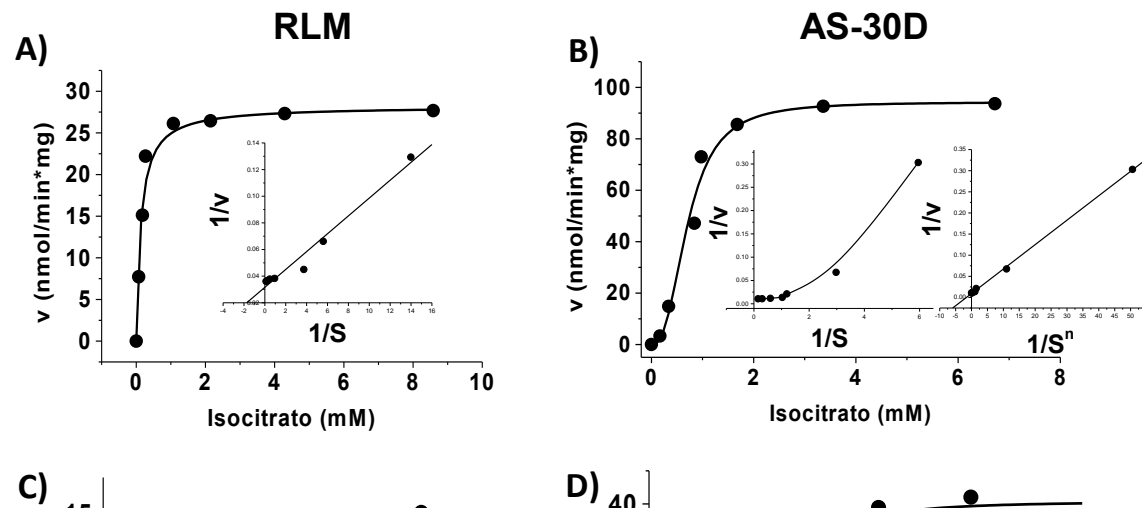


Figura 3. Efecto del magnesio y del manganeso en la actividad de la NAD^+ -ICDH de hígado de rata y de las células tumorales AS-30D. En el ensayo la concentración de MnCl_2 (A y B) y MgCl_2 (C y D) fue de 2 mM, así mismo se usaron concentraciones saturantes de NAD^+ (2.5 mM). Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del ajuste no lineal de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten (A) o Hill (B, C y D). En los insertos de cada figura se muestra el gráfico de dobles recíprocos, y en donde la enzima presentó cooperatividad se corrigió $1/S$ por $1/S^n$, siendo $n > 1$ y manteniendo R (coeficiente de determinación) cercana a 1.

A) $12 \uparrow$  B) 1

Figura 4. Efecto del MgCl_2 en la actividad de la NAD^+ -ICDH de hígado de rata (A) y de AS-30D (B). Las concentraciones de MgCl_2 empleadas fueron 0 (■), 0.5 (●), 1 (▲) y 2 (▼) mM. Los valores obtenidos se ajustaron para a la ecuación de Hill. Los parámetros cinéticos determinados se resumen en la siguiente Tabla.

	Hígado				AS-30D			
MgCl_2 (mM)	0	0.5	1	2	0	0.5	1	2
V_m (nmol/min*mg)	-	3.6	6.6	13.2	-	16	27	52
$K_m/K_{0.5}$ (mM)	-	1.2	1.1	1.38	-	4	3	1.4
N	-	0.95	1.2	1.7	-	2.5	1.77	2.9

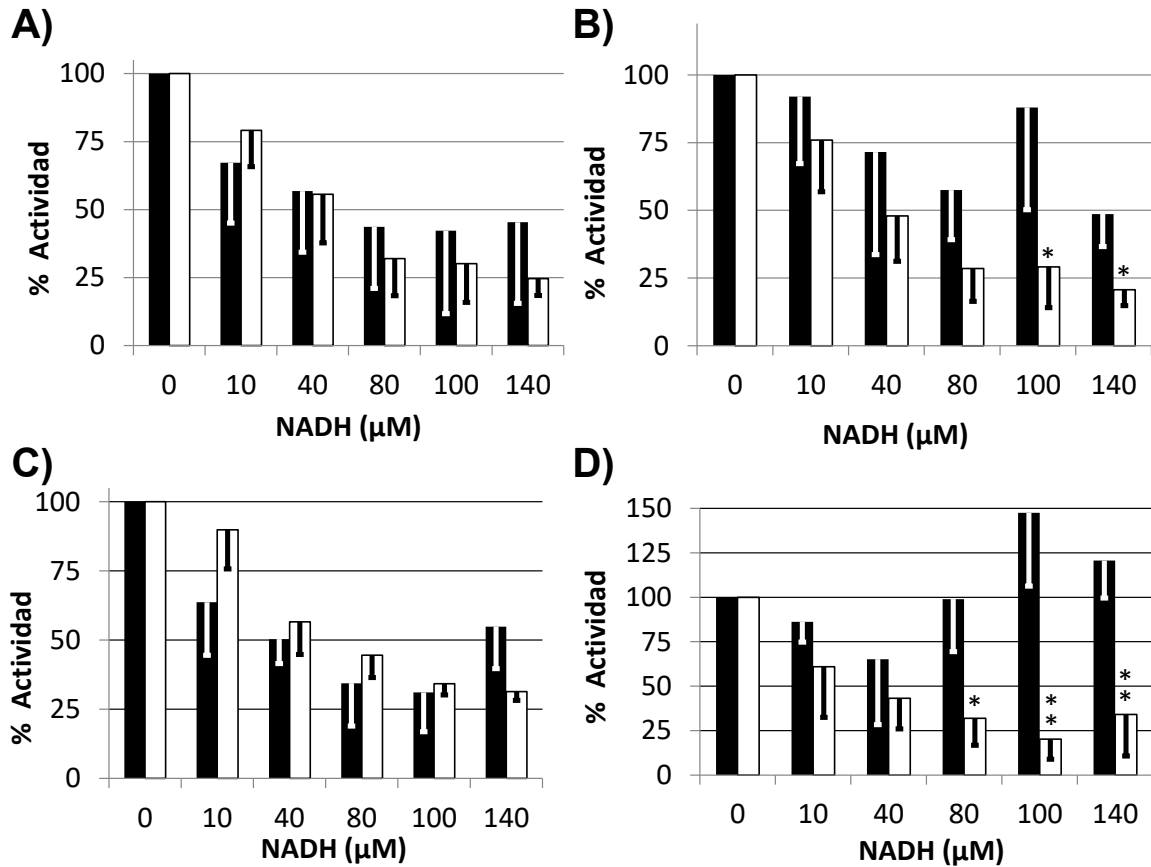


Figura 5. Inhibición de la NAD^+ -ICDH por NADH en presencia de MgCl_2 y/o ADP. Las barras negras corresponden a la enzima de hígado, y las barras blancas a la enzima de AS-30D. Inhibición por NADH con respecto a NAD^+ (A) o isocitrato (B) a concentraciones subsaturantes, en presencia de MgCl_2 2 mM. Inhibición por NADH con respecto a NAD^+ (C) o isocitrato (D) a concentraciones subsaturantes, en presencia de MgCl_2 (2 mM) y ADP (1 mM). Cuando las concentraciones del NAD^+ (0.3 mM) o isocitrato (1.5 mM) fueron subsaturantes, las concentraciones de isocitrato o NAD^+ fueron saturantes (6 y 2.5 mM, respectivamente). El 100% de la actividad para la enzima de hígado fue 7.6 ± 2 (A), 3.1 ± 0.1 (B), 9 ± 1 (C) y 6.1 ± 2.6 (D) nmoles/min*mg de proteína. Mientras que el 100% de la actividad para la enzima de AS-30D fue 25.8 ± 18 (A), 13.1 ± 1.5 (B), 30.4 ± 18 (C) y 14.2 ± 3.2 (D) nmoles/min*mg de proteína. Los valores en las gráficas corresponden a la media \pm DS de 3-5 determinaciones independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de student: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs hígado.

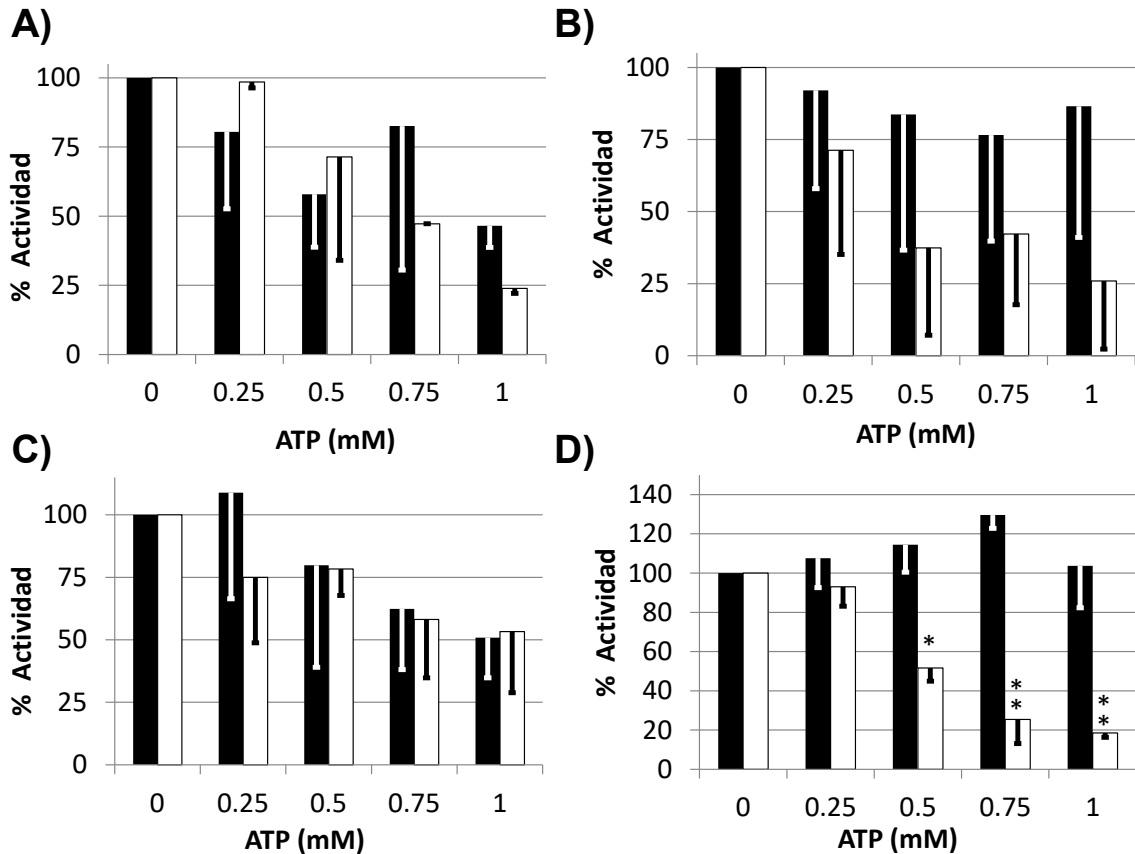


Figura 6. Inhibición de la NAD⁺-ICDH por ATP en presencia de MgCl₂ y/o ADP . Las barras negras corresponden a la enzima de hígado, y las barras blancas a la enzima de AS-30D. Inhibición por ATP con respecto a NAD⁺ (A) o isocitrato (B) en presencia de MgCl₂. Inhibición por ATP con respecto a NAD⁺ (C) o isocitrato (D) en presencia de MgCl₂ (2 mM) y ADP (1 mM). Cuando las concentraciones del NAD⁺ (0.3 mM) o isocitrato (1.5 mM) fueron subsaturantes, las concentraciones de isocitrato o NAD⁺ fueron saturantes (6 y 2.5 mM, respectivamente). El 100% de la actividad para la enzima de hígado fue 6.3± 1.2 (A), 3.8± 0.7 (B), 9± 0.7 (C) y 4.9 ± 0.12 (D) nmoles/min*mg de proteína. Mientras que el 100% de la actividad para la enzima de AS-30D fue 34 ± 14.6 (A), 11 ± 6.7 (B), 36 ± 9 (C) y 17.9 ± 2.7 (D) nmoles/min*mg de proteína. Los valores en las gráficas corresponden a la media ± DS de 3-5 determinaciones independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de student: * *p* < 0.05 y** *p* < 0.01 vs hígado.

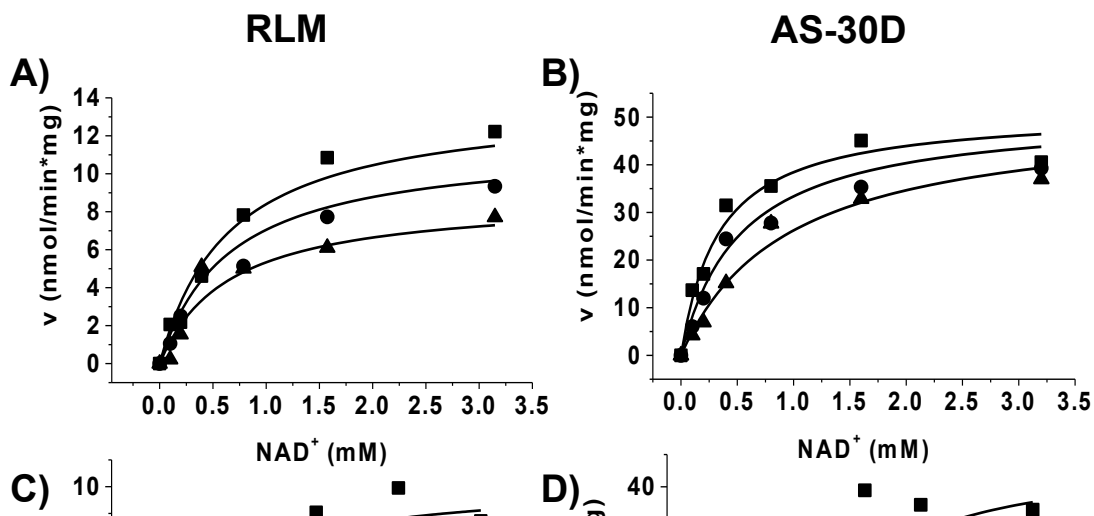


Figura 7. Inhibición de la NAD⁺-ICDH por NADH. Al evaluar el efecto del NADH con respecto al NAD⁺, las concentraciones de NADH empleadas fueron 0 (■), 25 (●) y 75 (▲) μM. Los valores obtenidos para la enzima de hígado se ajustaron a la ecuación de inhibición no competitiva simple (A) y los datos de AS-30D se ajustaron a la ecuación de inhibición competitiva simple (B). Cuando se evaluó el efecto del NADH con respecto al isocitrato, las concentraciones de NADH empleadas en hígado (C) fueron 0 (■), 5 (●) y 10 (▲) μM y las utilizadas en AS-30D (D) fueron 0 (■), 25 (●) y 75 (▲) μM. Los valores de velocidad se ajustaron a la ecuación de Monod-Wyman y Changeux de enlazamiento exclusivo (C y D).

Tabla 3. Resumen de los parámetros cinéticos de la NAD⁺-ICDH de hígado rata y de las células AS-30D.

Parámetro	Hígado		AS-30D	
V_m (nmol*min/mg)	15 ± 4		50 ± 10	
Sustrato	¹ Isocitrato	³ NAD ⁺	¹ Isocitrato	² NAD ⁺
K_m (mM)	3 ± 0.3	0.5 ± 0.14	5.71 ± 0.02	0.32 ± 0.1
$K_{i_{NADH}}$ (μM)	30 ± 17	87 ± 44	40 ± 8	75 ± 38
n	1.93 ± 0.5		2.33 ± 0.33	
L	1.5 ± 0.75		0.64 (2)	

Los valores obtenidos al ajustar los valores de velocidad a la ecuación de ¹Monod-Wyman y Changeux de enlazamiento exclusivo, ²inhibición competitiva e ³inhibición no competitiva. Los valores corresponden a la media de 2-3 determinaciones independientes.

2-Oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH)

En mitocondrias de hígado y de AS-30D se determinó la actividad de la 2-OGDH así como la afinidad por 2-oxoglutarato, CoA y NAD^+ , en presencia de MgCl_2 2 mM. La V_m fue 1.8 veces mayor en la enzima de AS-30D con respecto a la enzima de hígado y no se observaron cambios en la afinidad por los sustratos (Figura 8, Tabla 4).

El siguiente paso fue determinar el efecto inhibitorio del NADH y ATP en la actividad de la enzima. El NADH (80 μM) a concentraciones subsaturantes de NAD^+ inhibió aproximadamente el 50% de la actividad de la 2OGDH en ambos tipos de mitocondrias (Figura 9A), sin embargo el ADP (1 mM) activador de la enzima disminuyó el efecto inhibitorio del NADH (Figura 9C). En el caso del ATP como inhibidor respecto al NAD^+ como sustrato subsaturante, la enzima de AS-30D mostró la tendencia a ser más sensible con respecto a la enzima de RLM, pero esta diferencia no fue significativa (Figura 10A). En presencia de ADP, el ATP no inhibió a la enzima tumoral mientras que la enzima de hígado se activó alrededor de un 54 ± 23 % a concentraciones de 0.25 y 0.5 mM de ATP (Figura 10C).

Con respecto al 2-oxoglutarato (subsaturante), la enzima de AS-30D (con y sin ADP) mostró la tendencia a ser más sensible (50-70% de inhibición) que la de hígado en presencia de NADH (140 μM) sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos modelos (Figuras 9B y 9D). Mientras, que el ATP (0.5-1 mM) inhibió la actividad de la enzima de AS-30D alrededor de un 25 % en ausencia de ADP (Figura 10B) y el mismo porcentaje a la de hígado en presencia de ADP (Figura 10D).

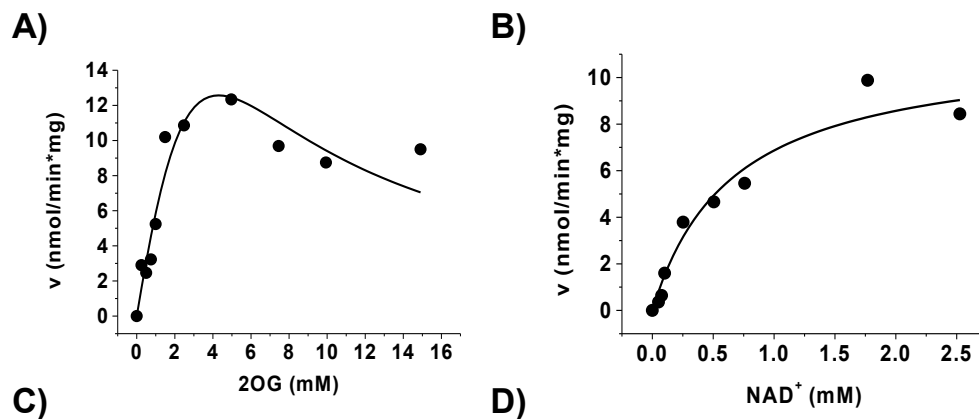


Figura 8. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima 2OGDH en hígado y en AS-30D. A y B; C y D corresponden a hígado de rata y a AS-30D, respectivamente. Los parámetros determinados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la 2-OGDH.

	Hígado	AS-30D
V_m	10 ± 4	18 ± 11
K_m 2OG	1.1 ± 0.9	1 ± 0.3
K_m NAD ⁺	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.18
K_m CoA	0.05	0.015

Los valores corresponden a la media de 1-3 determinaciones independientes.

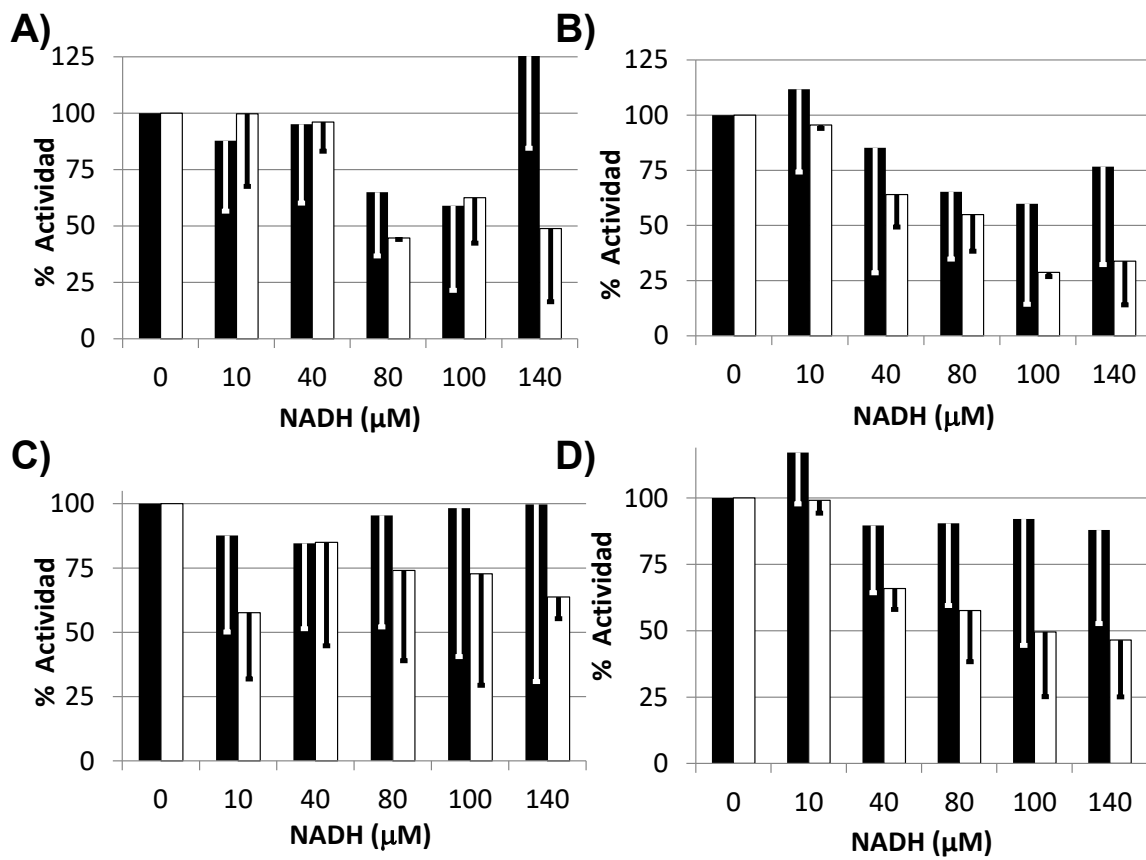


Figura 9. Inhibición de la 2-OGDH por NADH en presencia de MgCl₂ y/o ADP. Las barras negras corresponden a la enzima de hígado, y las barras blancas a la enzima de AS-30D. Inhibición por NADH con respecto a NAD⁺ (A) o 2-oxoglutarato (B) en presencia de MgCl₂ (2 mM). Inhibición por NADH con respecto a NAD⁺ (C) o 2-oxoglutarato (D) en presencia de MgCl₂ y ADP (1 mM). Cuando las concentraciones del NAD⁺ (0.4 mM) o 2-oxoglutarato (1 mM) fueron subsaturantes, las concentraciones de 2-oxoglutarato, NAD⁺ y CoA fueron saturantes (9, 2 y 0.5 mM, respectivamente). El 100% de la actividad para la enzima de hígado fue 68 ± 4.5 (A), 7.9 ± 3.5 (B), 6.5 ± 3.8 (C) y 7 ± 2.4 (D) nmoles/min*mg de proteína. Mientras que el 100% de la actividad para la enzima de AS-30D fue 5.13 ± 1.9 (A), 12 ± 9 (B), 5.1 ± 4.1 (C) y 13.4 ± 11.6 (D) nmoles/min*mg de proteína. Los valores en las gráficas corresponden a la media \pm DS de 3-5 determinaciones independientes.

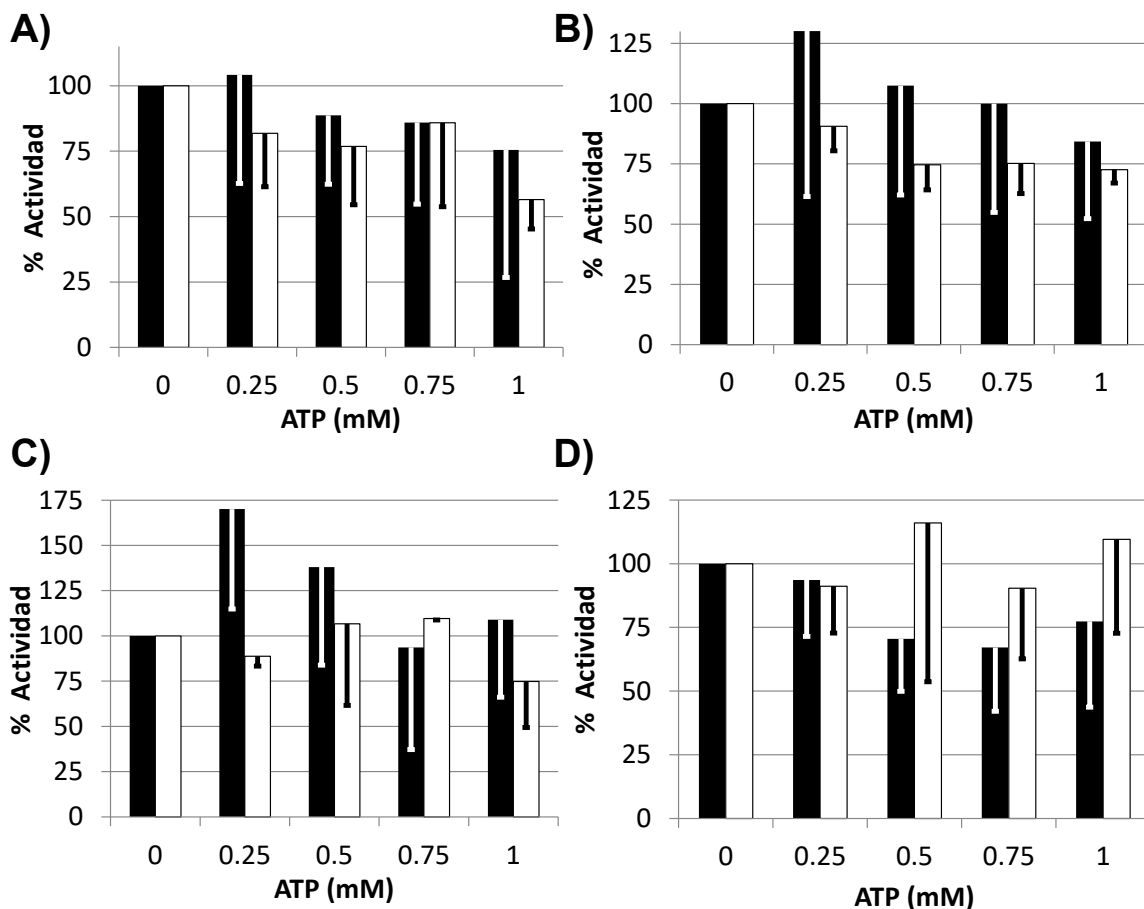


Figura 10. Inhibición de la 2-OGDH por ATP en presencia de MgCl₂ y ADP. Las barras negras corresponden a la enzima de hígado, y las barras blancas a la enzima de AS-30D. Inhibición por ATP con respecto a NAD⁺ (A) o 2-oxoglutarato (B) en presencia de MgCl₂ (2mM). Inhibición por ATP con respecto a NAD⁺ (C) o 2-oxoglutarato (D) en presencia de MgCl₂ y ADP (1 mM). Cuando las concentraciones del NAD⁺ (0.4 mM) o 2-oxoglutarato (1 mM) fueron subsaturantes, las concentraciones de 2-oxoglutarato, NAD⁺ y CoA fueron saturantes (9, 2 y 0.5 mM, respectivamente). El 100% de la actividad para la enzima de hígado fue 7.6 ± 3 (A), 8 ± 5 (B), 4.1 ± 1.9 (C) y 10 ± 4.5 (D) nmoles/min*mg de proteína. Mientras que el 100% de la actividad para la enzima de AS-30D fue 10.2 ± 7.5 (A), 16.1 ± 11.5 (B), 5 ± 4.2 (C) y 13 ± 10.9 (D) nmoles/min*mg de proteína. Los valores en las gráficas corresponden a la media \pm DS de 3-5 determinaciones independientes.

El complejo de la piruvato deshidrogenasa (cPDH)

En este caso se obtuvieron los parámetros cinéticos del complejo en mitocondrias aisladas de corazón de rata y de las células AS-30D. En los ensayos se emplearon mitocondrias lavadas para evitar la interferencia de la lactato deshidrogenasa (LDH) citosólica contaminante en la fracción mitocondrial (2-5 % ó 6 a 17 nmol*min/mg de proteína). Los valores de K_m obtenidos para la enzima de AS-30D fueron similares a los reportados anteriormente para el hepatocarcinoma Ehrlich-Letré (Lazo y Sols, 1980) (Tabla 5). Pero la V_m fue 3.7 veces menor que la determinada en mitocondrias de corazón (control de enzima no tumoral) y 14 veces mayor a la determinada en las mitocondrias de hígado (Tabla 5).

Como la actividad de este complejo multimérico disminuyó con el paso del tiempo, la determinación de los parámetros cinéticos se realizó en diferente orden. Así mismo, con base al reporte sobre que en el el complejo del hepatoma Erich-Letreé era activado por AMP ($K_{05} = 40 \mu\text{M}$, Lazo y Sols, 1980), se probó el efecto del AMP en la enzima de AS-30D pero no se observó cambio en la actividad hasta una concentración de 1 mM.

Tabla 5. Parámetros cinéticos del complejo de la PDH

<i>Tipo de mitocondrias</i>	Hígado	AS-30D	corazón	
V_m (nmol/min*mg)	1.37 ± 0.55	20 ± 6	75 (2)	
n = 2 -3 determinaciones independientes.				
K_m (μM)	Sustratos	Piruvato	CoA	NAD ⁺
	AS-30D	75 (2)	15 (2)	360 (2)
	Erich-Letreé*	20-40	15	700

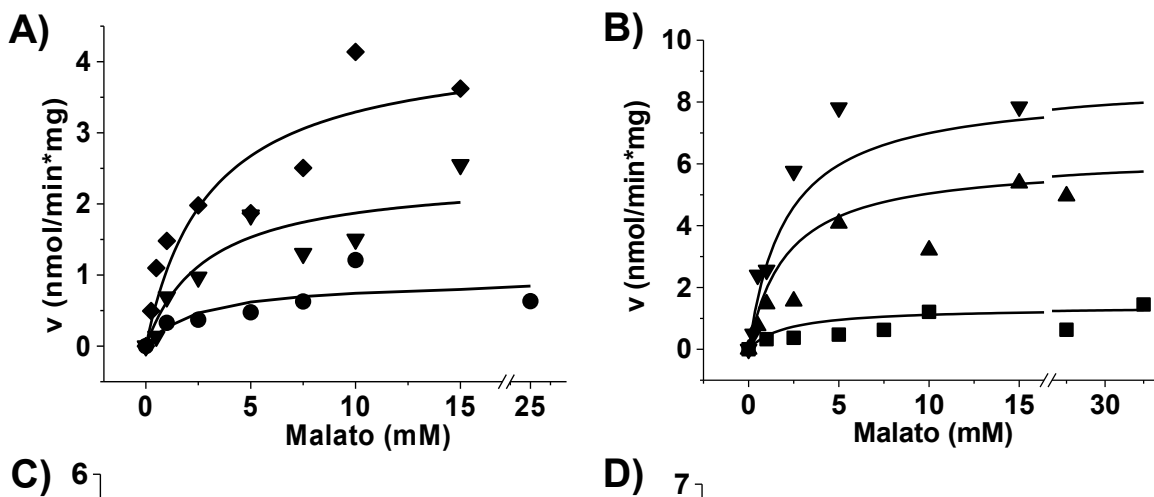
*Reportado: Lazo y Sols, 1980.

n = 2 -3 determinaciones independientes.

Enzima málica (ME)

La actividad de esta enzima se determinó en las mitocondrias de AS-30D y de corazón de rata, este último modelo se usó para comparar, debido a que en las mitocondrias de hígado no se encuentra esta enzima. El magnesio y el fumarato fueron activadores no esenciales de tipo mixto (respecto a malato) con valores de K_a , α y β de 23 mM, 0.33 y 0.24 para el magnesio y de 0.5 mM, 3.5 y 1.5, para el fumarato (Figura 11).

La V_m de la enzima en mitocondrias aisladas de corazón fue 8 veces mayor con respecto a AS-30D (40 y 6 nmol/min*mg, respectivamente) y fueron similares en cuanto a K_m (≈ 5 mM, por malato y NAD^+).



C) 6 **D) 7**
Figura 11. Efecto del MgCl_2 y del fumarato en la actividad de la enzima málica. En ambas gráficas se aprecia el efecto sobre la V_m y la afinidad (K_m) que ejercen el MgCl_2 (A) y el fumarato (B). Las concentraciones de MgCl_2 empleadas fueron 0 (■), 2 (●) y 5 (▲) mM; y las concentraciones de fumarato fueron 0 (■), 6 (●) y 9 (▲) mM. Los valores de velocidad se ajustaron a la ecuación de activadores de tipo mixto (A y B).

Glutamato deshidrogenasa (GDH)

Los parámetros cinéticos de la GDH se determinaron en la reacción *forward*, el sentido oxidativo. En ausencia de activador (Mg^{2+} o ADP) la enzima de ambos tipos de mitocondria presentaron similar V_m (AS-30D, 9 ± 1.4 nmol/min*mg; hígado, 12 ± 4 nmol/min*mg, n=3) y afinidad (K_m) por glutamato (AS-30D, 0.25 ± 0.018 mM; hígado, 0.25 ± 0.11 mM) y NAD^+ (AS-30D, 5.2 mM; hígado, 1.2 mM, n = 3); con inhibición por sustrato (a partir de 2 mM). En presencia $MgCl_2$ el valor de la K_m aumentó ligeramente a 0.34 y 0.36 mM, la V_m no cambió y ya no se observó inhibición por sustrato (hasta 10 mM de glutamato). En presencia de ADP (activador), en hígado se observaron dos isoformas con afinidad diferente por glutamato ($K_m = 0.1$ y 4 mM, respectivamente), lo que no ocurrió en las mitocondrias de AS30D, donde se encontró solo una isoforma con afinidad cercana a 1 mM (Figura 12). Por otra parte el ADP con respecto al NAD^+ , no tuvo efecto sobre la actividad ni la afinidad de la enzima en ambos modelos.

Glutaminasa

En la estandarización de la técnica se usaron dos medios de reacción HKE (HEPES 20 mM, KCl 140 mM, EGTA 1mM, pH 7.3) y SHE (Sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y pH 7.3) dando mejor actividad en el medio SHE.

La actividad de la glutaminasa se ensayó a los tiempos 0, 2, 5 y 10 minutos comportándose linealmente entre 5 y 10 minutos. Asimismo se hizo una curva de proteína (0.11, 0.22 y 0.44 mg de proteína mitocondrial) observándose que la actividad fue lineal

entre 0.11 y 0.22 mg. Con base a estos resultados la actividad de la enzima se determinó empleando 0.22 mg de proteína y 10 minutos de incubación.

Los parámetros cinéticos determinados para glutaminasa de hígado de rata fueron de $K_m = 8$ mM (2) y $V_m = 13.5$ (2) nmol/min*mg de proteína mitocondrial en presencia de amonio 3.5 mM; mientras que para la enzima tumoral se obtuvo una $K_{0.5} = 10.8 \pm 2.6$ (3) mM y $V_m = 67 \pm 31$ (3) nmol/min*mg de proteína, en presencia de fosfato 100 mM. Estos datos indicaron que la enzima de AS-30D fue alrededor de 3 veces más activa que la enzima de hígado. Al ajustar al modelo de Hill, la enzima tumoral presentó cooperatividad con respecto a la glutamina que se reflejó con un valor de $n = 2.0 \pm 0.3$ a diferencia de la de hígado que en presencia de amonio no presentó cooperatividad, con un valor de $n = 0.7$ (2).

La caracterización de esta enzima se realizó con la colaboración de Luis Ricardo Hernández Barrientos estudiante de la carrera de Química Farmacéutico Biológica, de la Facultad de Química, UNAM.

Aspartato amino transferasa (AAT)

Los valores de K_m obtenidos para la enzima de AS-30D fueron similares a los reportados para la enzima de hígado, 1.3 mM ($n = 2$) para 2-oxoglutarato y 0.62 mM ($n = 2$) para aspartato. De igual forma, los valores de V_m fueron similares entre ambas enzimas, 525 ($n = 2$) y 420 ± 250 ($n = 3$) nmoles/min* mg de proteína para la enzima de AS-30D e hígado, respectivamente.

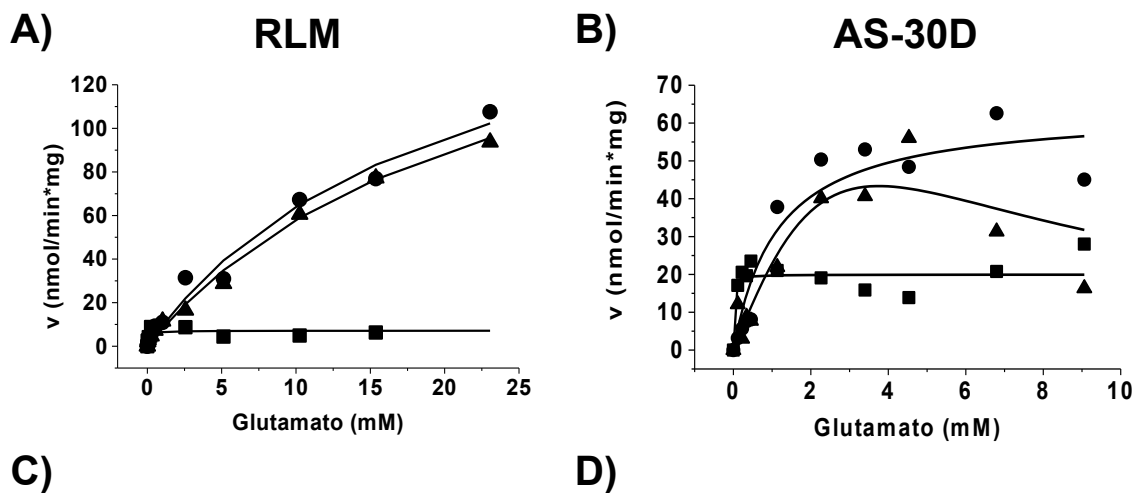


Figura 12. Activación de la GDH por ADP con respecto a glutamato. Las concentraciones de ADP empleadas en hígado (A) fueron 0 (■), 0.5 (●) y 1 (▲) mM y las utilizadas en AS-30D (B) fueron 0 (■), 0.75 (●) y 1 (▲) mM. Los valores de hígado y de AS-30D se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten. En C y D se muestran los regráficos de dobles recíprocos ($1/S$ vs $1/v$) para hígado (C) y AS-30D (D).

Eficiencia catalítica de las enzimas del ciclo de Krebs y anapleróticas

A partir de los parámetros cinéticos determinados para cada una de las enzimas del ciclo de Krebs y enzimas anapleróticas se calcularon las eficiencias catalíticas (V_m/K_m) encontrándose que la NAD^+ -ICDH y la 2OGDH fueron las enzimas menos eficientes en el ciclo de Krebs, en ambos tipos de mitocondrias (Tabla 6). Mientras que la glutaminasa en hígado y la enzima málica en AS-30D fueron las menos eficientes de las enzimas anapleróticas.

Tabla 6. Eficiencia catalítica (V_m/K_m) de las enzimas del ciclo de Krebs y anapleróticas.

<i>Enzima</i>	<i>Sustrato</i>	<i>RLM</i> V_m/K_m (L / min *mg)	<i>AS-30D</i>
PDH	<i>Pir</i>	1.8×10^{-5}	2.7×10^{-4}
*CS	<i>AcCoA</i>	0.099	0.42
	<i>OAA</i>	0.05	0.12
AC	<i>Cit</i>	4×10^{-5}	4.8×10^{-5}
NAD⁺-ICDH	<i>Isocit</i>	5×10^{-6}	8.8×10^{-6}
2OGDH	<i>2OG</i>	9.1×10^{-6}	1.8×10^{-5}
*SDH	<i>Succ</i>	2×10^{-3}	4×10^{-5}
*FH	<i>Fum</i>	6.6×10^{-4}	3.4×10^{-3}
	<i>Mal</i>	2×10^{-4}	9×10^{-4}
*MDH	<i>Mal</i>	1×10^{-3}	2.2×10^{-4}
	<i>OAA</i>	0.16	0.3

<i>Enzima</i>	<i>Sustrato</i>	<i>RLM</i> <i>V_m/K_m (L / min*mg)</i>	<i>AS-30D</i>
AAT	<i>Aspartato</i>	6.8 x 10 ⁻⁴	8.5 x 10 ⁻⁴
	<i>2OG</i>	3.2 x 10 ⁻⁴	4 x 10 ⁻⁴
GDH	<i>Glutamato</i>	4.8 x 10 ⁻⁵	3.6 x 10 ⁻⁵
Glutaminasa	<i>glutamina</i>	1.7 x 10⁻⁶	6.2 x 10⁻⁶
ME	<i>Mal</i>	ND	1 x 10⁻⁶

Eficiencia catalítica: L / min* mg. ND no detectado; RLM, mitocondrias de hígado de rata.
* Valores tomados de Del Mazo-Monsalvo, 2014

Concentración de metales (Mg²⁺ y Mn²⁺) y de metabolitos del ciclo de Krebs

Considerando que varias de las enzimas del ciclo de Krebs son dependientes de metales como el Mn²⁺ y el Mg²⁺, se determinó la concentración de estos en mitocondrias de hígado, de AS-30D y de corazón, el contenido total de ambos metales fue similar entre los diferentes tipos de mitocondrias (Tabla 7). Pero el magnesio fue el que se encontró en mayor concentración (180 - 300 veces) con respecto a manganeso. Por ello se determinó el magnesio libre en las mitocondrias de hígado, obteniéndose que en la matriz mitocondrial el magnesio se encontró a una concentración de 0.27 ± 0.1 mM (n=3), este valor se encuentra en el intervalo reportado (0.2 - 1.5 mM; Rodríguez-Zavala y Moreno-Sánchez, 1998). Debido a que no fue posible permeabilizar eficientemente las mitocondrias de AS-30D no se logró determinar la concentración de magnesio libre.

Así mismo, se determinó la concentración de isocitrato, 2-OG y NAD⁺, sustratos de la NAD-IDH y de la 2OGDH (Tabla 8). La concentración de isocitrato fue similar en las

mitocondrias de hígado y de AS-30D. En cuanto al 2OG y al NAD⁺, sus concentraciones fueron 2-4 veces mayores en AS-30D con respecto a hígado.

Tabla 7. Contenido total de Mg²⁺ y Mn²⁺ en mitocondrias aisladas de hígado, AS-30D y corazón.

nmol/mg	Hígado	AS-30D	Corazón
Mg ²⁺	532 ± 352 (3)	313 ± 146 (6)	389 (1)
Mn ²⁺	1.7 ± 1 (3)	1.2 ± 0.8 (4)	2.1 (1)

Los valores corresponden a la media de 1-6 determinaciones independientes.

Tabla 8. Concentración de metabolitos en la matriz mitocondrial de hígado y AS-30D.

Metabolito	Hígado	AS-30D
Isocitrato (μM)	207 ± 80	195 ± 50
NAD ⁺ (mM)	8.6 ± 4.9	18.2 ± 3.9
2OG (mM)	8 ± 4.7	34.4 ± 14.6

Los valores corresponden a la media de 3 determinaciones independientes.

DISCUSIÓN

El ciclo de Krebs es una vía de vital importancia para la célula ya que produce el poder reductor (NADH) que es utilizado por la cadena respiratoria para generar el gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP. En el caso de las células proliferativas, como las células tumorales, esta vía participa de manera importante en la síntesis de precursores para la formación de macromoléculas. Por ello, su estudio puede ser útil para proponer nuevos blancos terapéuticos, sobre todo considerando que estudios previos indican que esta vía contribuye en el control de la fosforilación oxidativa (Rodríguez-Enríquez et al., 2000), que es la principal fuente de ATP en la células tumorales (Zu y Guppy, 2004).

En un estudio previo se realizó la caracterización cinética de la mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs en mitocondrias aisladas de hígado de rata así como de células tumorales AS-30D (Del Mazo-Monsalvo, 2014). Sin embargo, una caracterización cinética más amplia de las enzimas 2-OGDH, NAD⁺-ICDH y AC, así como las caracterización cinética de las enzimas anapleróticas (cPDH, ME, GA, GDH y AAT) era necesaria para establecer posibles diferencias en los mecanismos de regulación de estas enzimas en las células tumorales y no tumorales.

En general la V_m de las enzimas analizadas fue 1.8 a 14.6 veces mayor en las mitocondrias de las células AS-30D con respecto a las mitocondrias de hígado, incrementos similares se han reportado para algunas enzimas del ciclo de Krebs y enzimas anapleróticas en ambos modelos (Dietzen y Davis, 1993; Del Mazo-Monsalvo, 2014; Rodríguez-Enríquez et al., 2015).

Por otra parte, los valores de K_m fueron similares entre las enzimas tumorales y no tumorales lo que sugiere que en ambos modelos se expresan las mismas isoformas. Pero en el caso de la GDH se observó la presencia de dos isoformas en las mitocondrias de hígado que mostraron diferente afinidad por glutamato, esto aparentemente inducido por la presencia de ADP. En mitocondrias de cerebro de bovino una concentración de 1 mM de ADP (concentración similar a lo que se usó en este estudio) induce un efecto similar en la afinidad por glutamato de las isoformas de la GDH (Bunik et al., 2016). Así mismo, en el caso de la GA de AS-30D, la sensibilidad que mostró la enzima por fosfato indica que se expresa la isoforma tipo K que es activada por fosfato (Patel y McGivan, 1984) a diferencia de las mitocondrias hígado que expresan la isoforma tipo L que es activada por amonio (Patel y McGivan, 1984; Verhoeven et al., 1983).

Aunque en el caso de la NAD^+ -ICDH los parámetros cinéticos y las constantes de inhibición no indicaron la presencia de alguna isoforma de esta enzima en las células tumorales AS-30D. La cinética sigmoidal que mostró la enzima en presencia de Mn^{2+} (a diferencia de la enzima de hígado que mostró una cinética hiperbólica) y la mayor sensibilidad a la inhibición por NADH y ATP con respecto al isocitrato a concentraciones subsaturantes, sugiere que la enzima puede tener algún tipo de mutación o que se trata de alguna isoforma, aunque de esta enzima no se han reportado isoformas. Pero es posible que existan isoformas de las subunidades regulatorias β y γ , ya que sus genes pueden generar dos o tres productos por *splicing* alternativo (Kim, 1999). Además, no solo se observa el efecto inhibitorio del NADH en presencia de ADP, sino en también en presencia de calcio, otro activador de la enzima como lo indica un reporte previo (Murphy et al., 1988).

La inhibición que ejercen el NADH y el ATP sobre la NAD^+ -ICDH a concentraciones sub-saturantes de isocitrato podría ser un mecanismo de regulación importante en ambos modelos debido a que las concentraciones de isocitrato determinadas en las mitocondrias oscilan alrededor de 200 μM por lo que las enzimas no estarían en condiciones saturantes de este sustrato mientras que el NAD^+ se encontraría en concentraciones saturantes. A diferencia de la NAD^+ -ICDH, la 2OGDH tumoral y la de hígado respondieron de la misma manera al efecto inhibitorio del ATP y del NADH a concentraciones subsaturantes de 2OG y NAD^+ , pero el efecto de estos metabolitos podría no ser tan importante porque las concentraciones determinadas de 2OG y NAD^+ serían saturantes, sin embargo faltaría determinar cuáles son los niveles de la CoA, otro de los sustratos de la enzima.

Otro punto interesante que puede influir en la regulación de algunas de las enzimas del ciclo de Krebs (AC, NAD^+ -ICDH y la 2OGDH) y enzimas anapleróticas (ME y GDH) es la concentración de Mg^{2+} libre, en hígado se determinó que la concentración de este metal se encuentra alrededor de 0.27 mM; lamentablemente no fue posible determinar el contenido en las mitocondrias de AS-30, pero considerando que el contenido total de Mg^{2+} fue similar en ambos modelos, es posible que la concentración de Mg^{2+} libre en las mitocondrias de AS-30D se aproxime a la determinada en hígado.

Debido a que un análisis de velocidad máxima no es suficiente para señalar a una enzima como limitante (o la que podría ejercer control sobre el flujo de una vía), una primera aproximación sobre si una enzima ejerce control en una vía metabólica es calcular la eficiencia catalítica (V_m/K_m) (Saavedra-Lira et al., 2005). La V_m y la K_m por separado, indican que tan rápido la enzima transforma el sustrato en producto y la afinidad con la que

la enzima se une a este, respectivamente. Al involucrar ambos parámetros, se indica la capacidad de la enzima de transformar el sustrato en producto. Si la enzima es poco eficiente, por convertir lentamente el sustrato en producto y/o requerir de altas concentraciones de sustrato para llevar a cabo su función; muy probablemente será una enzima limitante en el flujo, y podría ejercer control en la vía metabólica. (Fell, 1997). En este sentido, las enzimas con menor eficiencia catalítica en el ciclo de Krebs fueron la 2-OGDH y la NAD^+ -ICDH en ambos modelos y de las enzimas anapleróticas, la glutaminasa en hígado y la enzima málica en AS-30D. Esto se debe a que estas enzimas tienen una baja velocidad o una baja afinidad por sus sustratos. Por lo que se podrían considerar posibles sitios de control del flujo en el ciclo de Krebs.

Sin embargo este análisis no contempla que las concentraciones fisiológicas de sustratos, productos, inhibidores y activadores presentes puedan modificar la actividad de las enzimas. Por lo anterior, el siguiente paso es la construcción del modelo cinético a partir de los parámetros cinéticos de cada enzima así como de las concentraciones *in situ* de metabolitos de la vía, lo que permitirá esclarecer los mecanismos de regulación y control del ciclo de Krebs tumoral y de las enzimas anapleróticas, así como proponer, posibles blancos terapéuticos.

CONCLUSIONES

- La isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ tumoral fue la enzima que mostró cambios en la sensibilidad a sus inhibidores fisiológicos NADH y ATP .
- Las enzimas que pueden ejercer control sobre el flujo del ciclo de Krebs tanto en las células tumorales y como en hígado son la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, la glutaminasa y la enzima málica.

LITERATURA CITADA

- Aguirre JD, Culotta VC. (2012). Battles with iron: manganese in oxidative stress protection. *J Biol Chem.* 287:13541-8.
- Alberty RA. (2005). Thermodynamic properties of oxidoreductase, transferase, hydrolase, and ligase reactions. *Arch Biochem Biophys.* 435:363-8.
- Arismendi-Morillo G. (2009). Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:2062-8.
- Baggetto LG. (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie.* 74:959-74.
- Bergmeyer HU. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis.* VerlagChemie, Weinheim, 1983.
- Brière JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P. (2006). Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291:C1114-20.
- Bunik V, Artiukhov A, Aleshin V, Mkrtychyan G. (2016) Multiple Forms of Glutamate Dehydrogenase in Animals: Structural Determinants and Physiological Implications. *Biology (Basel).* 5:4.
- Carew JS, Huang P. (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer.* 1:9.
- Chen L, Zheng S. (2008) Identify alternative splicing events based on position-specific evolutionary conservation. *PLoS One.* 3:7.
- Dang CV. (2010). Glutaminolysis: supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle.* 9:3884-6.
- Del Mazo-Monsalvo. (2014). Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Dietzen DJ, Davis EJ. (1993). Oxidation of pyruvate, malate, citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 305:91-102.

- Dong LF, Jameson VJ, Tilly D, Cerny J, Mahdavian E, Marín-Hernández A, Hernández-Esquivel L, Rodríguez-Enríquez S, Stursa J, Witting PK, Stantic B, Rohlena J, Truksa J, Kluckova K, Dyason JC, Ledvina M, Salvatore BA, Moreno-Sánchez R, Coster MJ, Ralph SJ, Smith RA, Neuzil J. (2011). Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J Biol Chem.* 286:3717-28.
- Gauthier T, Denis-Pouxviel C & Murat JC. (1990) Respiration of mitochondria isolated from differentiated and undifferentiated HT29 colon cancer cells in the presence of various substrates and ADP generating systems. *Int J Biochem.* 22: 411–417.
- Globocan 2008, IARC, 2010. International Agency for Research on Cancer. WHO. Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008.
- Gunter TE, Gavin CE, Gunter KK. (2009). The case for manganese interaction with mitochondria. *Neurotoxicology.* 30:727-9.
- Gunter TE, Gerstner B, Lester T, Wojtovich AP, Malecki J, Swarts SG, Brookes PS, Gavin CE, Gunter KK. (2010). An analysis of the effects of Mn²⁺ on oxidative phosphorylation in liver, brain, and heart mitochondria using state 3 oxidation rate assays. *Toxicol Appl Pharmacol.* 249:65-75.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646-74.
- Hawkins CF, Borges A, Perham RN. (1989) A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* 255:77-82.
- Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Bakker BM, Westerhoff HV. (2007) Metabolic control analysis to identify optimal drug targets. *Prog Drug Res.* 64:173-89.
- Houston, M. A., Augenlicht, L. H., HeerdtM, B.G. (2011). Stable Differences in Intrinsic Mitochondrial Membrane Potential of Tumor Cell Subpopulations Reflect Phenotypic Heterogeneity. *Int J Cell Biol.* 2011:978583.
- Hsieh JY, Li SY, Tsai WC, Liu JH, Lin CL, Liu GY, Hung HC. (2015) A small-molecule inhibitor suppresses the tumor-associated mitochondrial NAD(P)⁺-

dependent malic enzyme (ME2) and induces cellular senescence. *Oncotarget*. 6:20084-98.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2008. Estadísticas a propósito del Día Mundial Contra el Cáncer. Datos Nacionales. Estadísticas Vitales, defunciones 2007.
- Kalia K, Zheng W, Jiang W. (2009). Importance of mitochondria in manganese-induced cellular toxicity. *Neurotoxicology*. 30:727.
- Kallinowski F, Schlenger KH, Kloes M, Stohrer M & Vaupel P (1989) Tumor blood flow: the principal modulator of oxidative and glycolytic metabolism, and of the metabolic micromilieu of human tumor xenografts in vivo. *Int J Cancer*. 44:266–272.
- Lanks KW & Li PW (1988) End products of glucose and glutamine metabolism by cultured cell lines. *J Cell Physiol*. 135:151–155.
- Lazo PA, Sols A (1980). Pyruvate dehydrogenase complex of ascites tumour. Activation by AMP and other properties of potential significance in metabolic regulation. *Biochem J*. 190:705-10.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers.
- Lenta MP, riehl MA. (1949). Dehydrogenase studies of tissue from normal and tumor-bearing mice; lactic and malic dehydrogenases. *Cancer Res*. 9:47-51.
- López-Gómez FJ, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. (1993). Control of oxidative phosphorylation in AS-30D hepatoma mitochondria. *Int J Biochem*. 25:373-7.
- Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB. (2012) IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 483:474-8.
- Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R. (2006) Determining

and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.* 273:1975-88.

- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. (2009). HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem.* 9:1084-101.
- Marín-Hernández, A. (2009). El Factor Inducido por la Hipoxia (HIF-1) y la Glucólisis en las células tumorales. *Revista de Educación Bioquímica*, 28: 42-51.
- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Encalada R, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. (2011) Modeling cancer glycolysis. *Biochim Biophys Acta.* 1807:755-67.
- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, López-Ramírez SY, García-García JD, Rodríguez-Zavala JS, Ruiz-Ramírez L, Gracia-Mora I, Zentella-Dehesa A, Sosa-Garrocho M, Macías-Silva M, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. (2012) Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Arch Toxicol.* 86:753-66.
- Maurice Israël, Laurent Schwartz. (2011). The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer.* 10:70.
- Miralpeix M, Azcon-Breto J, Bartrons R & Argilés JM (1990) The impairment of respiration by glycolysis in the Lewis lung carcinoma. *Cancer Lett.* 50:173–178.
- Moreadith RW, Fiskum G. (1984) Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin. *Anal Biochem.* 137:360-7.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. (2007) Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274:1393-418.
- Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Olín-Sandoval V. (2008). Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol.* 2008:597913.

- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC. (2009) The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors*. 35:209-25.
- Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Quezada H, Westerhoff HV. (2010) Metabolic control analysis indicates a change of strategy in the treatment of cancer. *Mitochondrion*. 10:626-39.
- Müller-Esterl (2008). *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Versión Española por Dr. Centelles Serra. Reverté, Barcelona.
- Murphy AN, Kelleher JK, Fiskum G. (1988) Calcium sensitive isocitrate and 2-oxoglutarate dehydrogenase activities in rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 157:1218-25.
- Nelson DL, Cox MM. (2008) *Lehninger principles of biochemistry*. 5th Edit.
- Onozuka H, Tsuchihara K, Esumi H. (2011) Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci*. 102:975-82.
- Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*. 277:30409-12.
- Panteghini M. (1990) Aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clin Biochem*. 23:311-9.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 25: 4633-4646.
- Piva & McEvoy-Bowe. (1998) Oxidation of glutamine in HeLa cells: role and control of truncated TCA cycles in tumour mitochondria. *J Cell Biochem*. 68:213-25.
- Pollard PJ, Wortham NC, Tomlinson IP. (2003) The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. *Ann Med*. 35:632-9.
- Prado-Garcia H. (2011). Tumor cell metabolism an integral view. *Cancer Biol Ther*. 12:939-948.

- Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, Moreno-Sánchez R. (2010) Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Mol Aspects Med.* 31:29-59.
- Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. (2010) The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med.* 31:145-70.
- Reisch AS, Elpeleg O. (2007) Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc. *Methods Cell Biol.* 80:199-222.
- Robey RB, Hay N. (2009). Is Akt the “Warburg kinase”? A energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 19:25-31.
- Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. (1998). Intermediary metabolism of fast-growth tumor cells. *Arch Med Res.* 29:1-12.
- Rodríguez-Enríquez S, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. (2000). Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 375:21-30.
- Rodríguez-Enríquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodríguez FL, Marin-Hernandez A, Ruiz-Azuara L & Moreno-Sanchez R (2006) Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 215: 208–217.
- Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L, Moreno-Sánchez R. (2009) Targeting of cancer energy metabolism. *Mol Nutr Food Res.* 53:29-48.
- Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandoval V, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. (2010) Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol.* 42:1744-51.
- Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Aguilar-Ponce JL, Mandujano-Tinoco EA, Meneses A, Moreno-Sánchez R. (2011) Oxidative

phosphorylation as a target to arrest malignant neoplasias. *Curr Med Chem.* 18:3156-67.

- Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Dong LF, Akporiaye ET, Neuzil J, Ralph SJ, Moreno-Sánchez R. (2012) Molecular mechanism for the selective impairment of cancer mitochondrial function by a mitochondrially targeted vitamin E analogue. *Biochim Biophys Acta.* 1817:1597-607.
- Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, El Hafidi M, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Rodríguez-Zavala JS, Pacheco-Velázquez SC, Moreno-Sánchez R (2015) Mitochondrial free fatty acid β -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 65:209-21.
- Rodríguez-Zavala JS, Moreno-Sánchez R. (1998). Modulation of oxidative phosphorylation by Mg^{2+} in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 273:7850-5.
- Rogers A., Gibon Y. (2009). Chapter 4 Enzyme Kinetics: Theory and Practice. 71-103. J. Schwender (ed.), *Plant Metabolic Networks*.
- Saavedra-Lira E, Encalada R, Pineda E, Jasso-Chávez R, Moreno-Sánchez R. (2005). Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. *FEBS J.* 272:1767-83.
- Sauer LA (1977) On the mechanism of the Crabtree effect in mouse ascites tumor cells. *J Cell Physiol.* 93:313–316.
- Saunier E, Benelli C, Bortoli S. (2016) The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: An old metabolic gatekeeper regulated by new pathways and pharmacological agents. *Int J Cancer.* 138:809-17.
- Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin Invest.* 118:3930-42.
- Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy

A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 483:479-83.

- Tysnes, B, Bjerkvig R. (2007) Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochem. Biophys. Acta*. 1775:283-297.
- Voet D, Voet J. (1995). *Biochemistry*. 2nd edition. John Wiley and Sons.
- Vogelstein B, Kinzler KW. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med*. 10:789-799.
- Walden WE. (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science*. 314:1903-8.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*. 3191:309-14.
- Wenner CE. (2012) Targeting mitochondria as a therapeutic target in cancer. *J Cell Physiol*. 227:450-6.
- Yogeve O, Naamati A, Pines O. (2011). Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. *FEBS J*. 278:4230-42.
- Yu D, Shi X, Meng G, Chen J, Yan C, Jiang Y, Wei J, Ding Y. (2015) Kidney-type glutaminase (GLS1) is a biomarker for pathologic diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 6:7619-31.
- Zu XL, Guppy M. (2004) Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*. 313:459-65.