



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

***EFFECTO DEL AMONIO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y  
LA ACTIVIDAD DE LA GDH EN CARCINOMAS METASTÁSICOS  
HUMANOS DE PRÓSTATA Y COLON.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

**JOAQUÍN ALBERTO PADILA FLORES.**

TUTORAS:

DRA. SILVIA CECILIA PACHECO VELÁZQUEZ.

DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ.

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARTHA O. SALCEDO ÁLVAREZ,

DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO.

DR. FEDERICO ÁVILA MORENO.

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2021





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.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES A:**

### **Mis tutoras:**

**Dra. Sara Rodríguez** por abrirme la puerta y darme la oportunidad de integrarme al departamento de bioquímica, por su confianza para colaborar en el proyecto. Por ser guía en este proceso formativo y procurarnos con su saber, por estar al pendiente de nosotros y nuestro crecimiento.

**Dra. Silvia C. Pacheco** por ser tutora, guía y amiga, por siempre ir más allá del deber. Por siempre preocuparte, preguntar y escuchar dentro y fuera del laboratorio. Por dar siempre la mejor disposición; desde el detalle más pequeño de no encontrar algo hasta dudas, revisiones o preparaciones previas a presentar fuera de horas laborales, siempre sin importar cuanto trabajo tuvieras.

### **Los investigadores que aportaron con su conocimiento, críticas y consejos durante la realización en cada seminario:**

**Dr. Rafael Moreno Sánchez**, por permitirme colaborar con el proyecto y por guiarnos en cada seminario, por orientarnos a construir una mentalidad analítica de ver más allá, por el alto estándar de formación y el continuo desafío.

**Dr. Álvaro Marín Hernández**, por siempre tener la puerta abierta de su laboratorio y la mejor disposición, por compartir su conocimiento conmigo durante la realización de este proyecto.

**Dr. Javier Alejandro Belmont García**, por siempre su buena disposición y proactividad para resolver dudas y enseñar, por su mentalidad analítica, por impulsarnos a ver más allá.

**Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez**, por guiarnos en el día a día del laboratorio, por orientarnos con sus críticas y consejos.

**M en C. Diana Robledo Cadena**. Por los continuos cuestionamientos en seminario para solidificar nuestra formación, por su siempre buena disposición en orientarnos en el día a día del laboratorio.

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

**A los financiamientos para la realización de este proyecto:**

**SEP-CONACYT No. 283144 Dra. Sara Rodríguez Enríquez**  
**Ciencia de Frontera-CONACyT No. 6379 Dr. Rafael Moreno Sánchez**  
**Ciencia de Frontera-CONACyT No. 377873 Dra. Silvia Cecilia Pacheco Velázquez.**

**Al comité tutorial; Dra. Martha O. Salcedo Álvarez, Dr. Ignacio Peñalosa Castro y Dr. Federico Ávila Moreno** por sus valiosas observaciones y su entera disposición en la revisión de este trabajo.

#### **AGRADECIMIENTOS PERSONALES A:**

**La familia Centeno-Thompson** (Mr. Miguel, Mrs. Montse, Fernanda, Daniela, Arli, Blue, Lukas, Mila y Presley). Gracias por apoyarme y ser tan comprensivos conmigo; por ir más allá del ámbito laboral, gracias por brindarme su confianza, permitirme conocerlos como personas y compartir con ustedes. Por hacer que sea más que un trabajo, por su siempre buena disposición sin importar si es muy temprano (6:30 am), si fuese fin de semana, si llueve o si ha anochecido e incluso con una pandemia.

Su apoyo, me ayudo en la realización de este proyecto y demás metas académicas que he alcanzado en este tiempo, sépanlas como tuyas también. Gracias por apoyarme en esta etapa de mi vida y tenderme su mano para sobrellevar mi formación académico-laboral-personal, gracias por creer en mi e impulsarme.

Los miles de kilómetros recorridos en estos años de caminata junto a Blue, Arli, Mila, Lukas y Presley siempre me permiten ordenar mis ideas en el proceso, como a Blue.

El@s me dieron su corazoncito y yo les di el mío.

Ha sido todo un gusto y un honor compartir con ustedes.

Muchas gracias.

## **Dedicatorias.**

### **A Mamaela.**

Las abuelitas son un regalo del cielo y tuve la dicha de tener a una persona increíble con un corazón gigantesco junto a mí. Más que una abuela, una segunda mamá. Mi mamaela.

No importaba la edad, ni la ocasión siempre estabas ahí para darnos todo de ti, siempre con amor. Gracias por enseñarme el valor del trabajo. Creo que por ti, todos somos así de aferrados, lo tercos, necios lo traemos en la sangre; por enseñarme a darlo todo, aunque estemos cansados. Gracias por siempre respaldarme, aunque sea a la distancia.

Las gracias no bastan para todo lo que hiciste y las palabras no alcanzan para explicar todo lo que me haces sentir y lo que me inspiras.

Siempre esperé que pudieras verme llegar hasta aquí, que pudieras seguir viéndome crecer, darte un poquito de todo lo que me diste, voltear en medio del examen profesional y verte sentada escuchando, pero desafortunadamente el tiempo no nos alcanzó, ni una vida iba a ser suficiente.

Vives y me acompañas en todo lo que hago, en mi mente, en mi corazón y tatuada en la piel.

Siempre a dar todo, como aprendí de ti.

Gracias por 23 años conmigo, por 69 de grandeza.

En tu memoria.

**A mi Papá,** Joaquín Padilla Hernández.

Mi mas grande influencia; gracias por ser un papá excepcional y ser así de luchón. Me has dado todo cuanto está en tus manos, este logro también te pertenece; este título es tuyo. He llegado aquí porque tuve un excelente modelo a seguir, estoy aquí porque también me enseñaste a que, si se va a hacer algo hay que ir siempre a darlo todo. Por descansar al final, no a la mitad, estamos aquí no por suerte, estamos aquí por todas las madrugadas en vela, por las 3:00-4:00 am, me enseñaste tu resiliencia y convicción; si caemos hay que levantarse y siempre seguir adelante.

**A mi Mamá,** María Elena Flores Bolaños.

Gracias a ti soy una persona integral y me he desarrollado en todos los aspectos de la vida, me ayudo a formar una mentalidad crítica, curiosa, que me ha traído hasta aquí. Me enseñaste a no quedarme con las ganas y a luchar por las cosas que quiero, a redefinir una y otra vez mis limites; gracias por todas estas oportunidades. Gracias por curar mis heridas cuando he caído. Este título también te pertenece.

A Kiara.

Por ser mí siempre fiel compañera, tu llegada marcó un antes y un después. Cuando caigo, verte recostada a mi lado esperando tranquila y serena, descubro una y otra vez que «la felicidad no es mas que un animal que duerme tranquilo» y cuando estoy de nuevo listo para comerme el mundo, continuas conmigo para correr por ello.

A Lucero Vázquez Carbajal.

En la vastedad de posibilidades del tiempo y el espacio, pudimos coincidir y compartir muchas cosas, me enseñaste un mundo. Te vi crecer y me ayudaste a crecer a la par; me ayudaste a conocerme, a desarrollarme y creíste en mi cuando era difícil de ver, me impulsaste y ayudaste en momentos difíciles, siempre te agradeceré haber estado al pie del cañón de esta meta. Gracias, siempre.

Cuando contaba sesenta y siete años, nueve antes de su muerte en 1955, Einstein resumía así una vida de investigación: «Más allá está un mundo intenso, que existe al margen de nosotros, los seres humanos, y se nos muestra como un grandioso y eterno enigma, aunque parcialmente accesible a nuestro análisis y especulación. La contemplación de este mundo nos llama como liberación...El camino hasta este paraíso no es tan confortable ni tentador como el que conduce al edén, aunque se nos ha mostrado seguro y digno de confianza. Por mi parte no lamento en absoluto haberlo escogido».

Carl Sagan, 1974. *Cerebro de Broca*.

“...Entonces, se me hizo la luz; pues entendí que la base de la medicina y de la fisiología es la bioquímica, la química de la vida”

Dr. Edmundo Chávez.

## **Abreviaturas.**

**ACO**; Aconitasa.

**AMP**; Adenosín monofosfato cíclico.

**AMPK**; Proteína quinasa activada por AMP (por sus siglas en inglés: *AMP-activated protein kinase*)

**ARG**; Arginasa.

**ASL**; Argininosuccinato Liasa.

**ASS1**; Arginosuccinato Sintasa.

**ATCC**; Colección Americana de Cultivos "Tipo" (por sus siglas en inglés: *American Type Culture Collection*).

**ATP**; Trifosfato de adenosina.

**CONACyT**; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

**CPS1**; Carbamoil Fosfato Sintetasa 1

**CS**; Citrato Sintasa.

**CXCR4**; Receptor de quimioquinas 4.

**DMEM**; Medio Dulbecco modificado por Eagle (por sus siglas en inglés: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

**FH**; Fumarasa,

**GBM**; Glioblastoma.

**GDH1/2**; Glutamato Deshidrogenasa 1/2.

**GLS**; Glutaminasa

**GLUD1/2**; Gen codificante para GDH1/2.

**GOT**; Aspartato aminotransferasa.

**GOT1**; Aspartato aminotransferasa, isoforma citosólica.

**GPx**; Glutación Peroxidasa.

**GR**; Glutación Reductasa,

**GS**; Glutamina Sintetasa.

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>**; Bicarbonato.

**HePM**; Mitocondrias de Hepatoma de rata (por sus siglas en inglés: *Rat Hepatoma mitochondria*).

**IDH**; Isocitrato Deshidrogenasa

**IDH2**; Isocitrato Deshidrogenasa 2

**KG**;  $\alpha$ -Ketoglutarato.

**MDH**; Malato Deshidrogenasa.

**MDH1**; Malato Deshidrogenasa 1, isoforma citosólica.

**mRNA**; Ácido ribonucleico mensajero.

**mTORC1**; Complejo 1 de rapamicina de mamíferos (Por sus siglas en inglés *mammalian Target of Rapamycin 1*).

**MWC**; Monod-Wyman-Changeux.

**Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>**; sodio/potasio.

**NAD<sup>+</sup>/NADH+H**; Forma oxidada/reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina.

**NH<sub>4</sub>Cl**; Cloruro de amonio.

**OTC**; Ornitina transcarbamoilasa.

**PBS**; Buffer de fosfatos salino (por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*).

**P<sub>i</sub>**; Fosforo inorgánico.

**PP2A**; Proteína Fosfatasa 2A

**PTEN**; Tirosina fosfatasa.

**RHM**; Mitocondrias de corazón de rata (por sus siglas en inglés: *Rat Hepatoma Mitochondria*)

**RLM**; Mitocondrias de hígado de rata (por sus siglas en inglés: *Rat Liver Mitochondria*)

**SCS**; Succinil-CoA Sintetasa.

**SDH**; Succinato Deshidrogenasa.

**SLC1A3**; Transportador de aspartato/glutamato.

**SLC7A25/ASCT2**; Transportador de glutamina localizado en la membrana celular de la familia SLC1.

**TH**; Tirosina Hidroxilasa

**ULK1/ULK2**; Por sus siglas en inglés *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1/2*.

**V<sub>max</sub>**; Velocidad máxima.

**α-KGDH**; α-Ketoglutarato Deshidrogenasa.

## Resumen

La reprogramación metabólica es un fenómeno frecuente en tumores que, en parte, permite optimizar el consumo de esqueletos de carbono y nitrógeno para la síntesis anabólica de macromoléculas necesarias para sustentar procesos de proliferación y migración.

En células no-cancerosas, el amonio es considerado como un desecho del metabolismo de aminoácidos el cual puede comportarse químicamente con alta toxicidad (al competir el amonio con el potasio en la bomba sodio/potasio modifica el gradiente electroquímico de dichos iones y generando acidosis metabólica). Sin embargo, este metabolito se encuentra presente en el microambiente tumoral a concentraciones mayores (0.14- 5 mM) que en tejidos sanos o plasma en el orden de 0.027-0.05 mM. Al parecer, el aumento de amonio en células tumorales está al proceso de oxidación activa de la glutamina. Estudios recientes demostraron que el amonio suplementado al medio de cultivo de varios tipos de carcinomas (mama, hígado, colon, próstata, pulmón y neuroblastoma) es activamente metabolizado en las vías anabólicas por la reacción reversa de la glutamato deshidrogenasa (GDH). La GDH cataliza 1) la desaminación de glutamato a  $\alpha$ -ketoglutarato (ácido dicarboxílico que se incorpora al ciclo de Krebs), 2) la liberación de amonio y 3) la reducción NAD(P)<sup>+</sup> a NAD(P)H+H. El favorecimiento de la reacción reversa de la GDH implica la incorporación y “asimilación” del amonio; proponiéndose como fuente de nitrógeno para la proliferación celular.

## Resultados:

En el presente trabajo fueron incluidas líneas celulares metastásicas de cáncer de próstata (PC3), colon (HCT116 y COLO205) y de baja metástasis (DU145), las cuales fueron expuestas a concentraciones fisiológicas y patológicas (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mM) de NH<sub>4</sub>Cl en presencia o ausencia de glutamina para impulsar la incorporación de amonio como única fuente de nitrógeno. El efecto citotóxico del amonio se analizó midiendo la densidad celular, tiempo generacional e índice de duplicación ( $\mu$ ) durante 7 días de cultivo *in vitro*. A este respecto, la aplicación del amonio (5-10 mM) promovió la proliferación celular de líneas celulares en un rango de 37-107%, reduciéndose el tiempo de duplicación celular entre 8-30 horas, e incrementando la densidad celular en cerca de 0.4 a 2 veces. Mientras que, en la condición libre de glutamina la ausencia de este aminoácido afectó la proliferación y el amonio como fuente de nitrógeno, no la rescató; excepto en COLO 205 donde 0.1-5 mM de NH<sub>4</sub>Cl aumentó

la proliferación en 16-66%. Con esta información se eligió la condición de 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 5 días de cultivo para los experimentos de contenido de proteína y actividad enzimática. El contenido de proteína total de la GDH 1/2 no presentó diferencias entre las células incubadas con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  *versus* células control. Sin embargo, la actividad de la GDH ( $V_{maxrev}$ ) en las células expuestas a 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  incrementó de 0.3-3 veces. Esta información sugiere que la suplementación de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  estimula el índice de proliferación celular en líneas metastásicas de próstata y colon y que, un mecanismo para atenuar la toxicidad por amonio es la activación enzimática de la GDH.

## **Conclusión**

La suplementación de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  estimula la proliferación celular de las líneas metastásicas de próstata PC3 y colon (HCT116 y COLO205). Sin embargo, no todas las líneas celulares son capaces de utilizar dicho metabolito como fuente de nitrógeno (DU145). El contenido de proteína de la GDH no presenta diferencias significativas entre las células expuestas a 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y las células libres de tratamiento; sin embargo, el incremento en la actividad de la GDH en células (PC3, HCT116 y COLO25) expuestas a 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  podría modularse por modificaciones postraduccionales, como fosforilación y acetilación.

## Índice.

<b>1.- Introducción</b>	1
1.1.- Cáncer; problema de salud pública en México y el mundo	1
1.2.- Hallmarks del Cáncer y Metabolismo energético	2
1.3.- Metabolismo mitocondrial en células de cáncer	3
1.4.- Metabolismo de aminoácidos en células cancerosas	4
1.5.- Metabolismo del amonio	5
<b>1.6.- GDH y asimilación de amonio</b>	7
<b>2.- Justificación</b>	10
<b>3.- Hipótesis</b>	10
<b>4.- Objetivos</b>	10
<b>5.- Metodología</b>	11
5.1 Modelos de estudio	11
5.2 Cultivo celular	12
5.3 Curvas de Crecimiento	12
5.4 Western Blot	12
5.5 Actividad enzimática	12
<b>6.- Resultados</b>	15
6.1 Curvas de Crecimiento	15
6.1.1 Líneas celulares Cancerosas	15
6.1.2. Líneas celulares no cancerosas	19
6.2 Contenido de proteína GDH	23
6.3 Actividad enzimática GDH ( $V_{maxrev}$ )	13
<b>7.- Discusión</b>	24
7.1 El amonio estimula la proliferación de células cancerosas altamente metastásicas	24
7.2. El amonio no estimula la proliferación de células no cancerosas	25
7.3 La exposición a amonio no aumenta el contenido de la GDH	26
7.4 Incremento de la actividad de la GDH en presencia de amonio	27
<b>8.- Conclusiones</b>	29
<b>9.- Perspectivas</b>	29
<b>Referencias</b>	31
<b>Anexos</b>	36

## 1.- Introducción.

### 1.1 Cáncer; problema de salud pública en México y el mundo.

El cáncer es un conjunto de enfermedades entre cuyas características principales destaca mantener una división celular descontrolada y presentar metástasis, es decir la capacidad de diseminarse a otros tejidos. La metástasis es la principal causa de muerte por este padecimiento (Organización Mundial de la Salud, 2018)

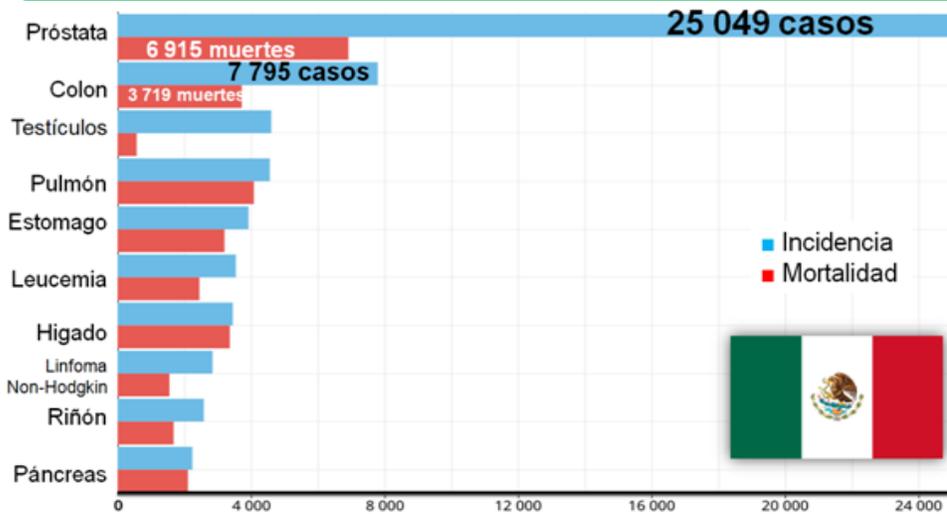
A nivel mundial el cáncer es la segunda causa principal de muerte con 9.6 millones de muertes en el 2018 (Organización Mundial de la Salud, 2018). Los cánceres de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los tipos de cáncer más comunes en hombres, mientras que el de mama, colorrectal, pulmón, cérvix y tiroideo son los más comunes en las mujeres (Figura 1; GLOBOCAN, 2018).



**Fig. 1, Principales cánceres en el mundo. Incidencia y mortalidad** con respecto a ambos sexos en todas las edades (GLOBOCAN, 2018).

En el año 2018 se describió que el cáncer de próstata representa una de las principales neoplasias en la población mexicana del género masculino, señalando una incidencia de 25,049 nuevos casos, así como el mayor número de muertes por cáncer (6,915), seguido por el cáncer de colon con incidencia de 7,795 casos y 3,719 muertes. (Figura 2; GLOBOCAN, 2018).

### Cáncer en México en la población masculina: Incidencia y mortalidad (2018)

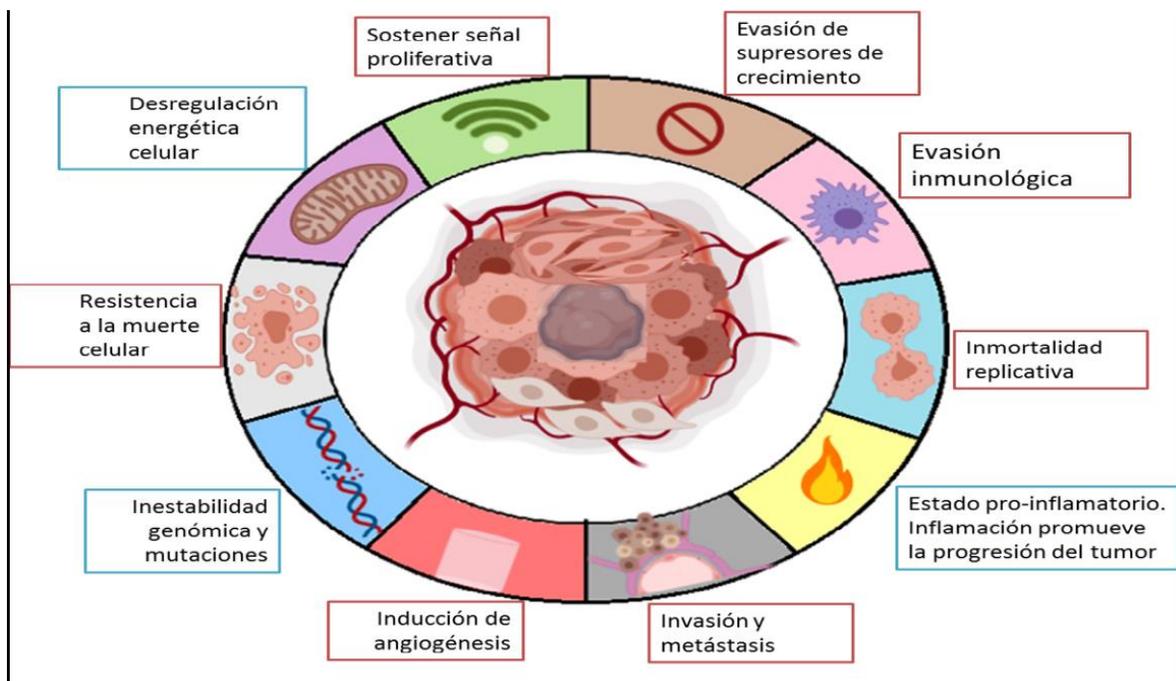


**Fig. 2, Principales cánceres en la población masculina mexicana.** Incidencia y mortalidad, todas las edades (GLOBOCAN, 2018).

Lamentablemente se prevé que para el 2040, los casos de cáncer aumentarán cerca del 63% comparado con el año 2020 a nivel mundial. Los países en vías de desarrollo no cuentan con la infraestructura apropiada para ofrecer métodos de detección y estrategias de tratamiento oportunas. Tal es el caso de México, donde se estima un aumento del 89% de casos de cáncer para ese año (GLOBOCAN, 2018).

#### 1.2.- Hallmarks y Metabolismo energético del cáncer.

Los *hallmarks* del cáncer son características distintivas que le permiten a las células tumorales sobrevivir, proliferar, diseminarse a otros tejidos e invadir. El análisis en conjunto de estos *hallmarks* moleculares permite entender la biología y el comportamiento de las células neoplásicas. (Hanahan y Weinberg, 2000) (Fig. 1). El metabolismo tumoral se ha propuesto como un *hallmark* molecular (Negrini et al., 2010; Luo et al., 2009; Colotta et al., 2009, Hanahan y Weinberg, 2011) (Fig. 3). Durante la progresión tumoral la reprogramación del metabolismo es un fenómeno frecuente en células cancerosas para optimizar el consumo de esqueletos de carbono y nitrógeno para la síntesis de macromoléculas para sostenerla proliferación y la migración del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011. Pascual, 2018, Keshet, et al., 2018). Por lo que el análisis del metabolismo energético tumoral emerge como una alternativa potencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas (Hensley et al., 2013).



**Fig. 3.** *Hallmarks* moleculares del cáncer (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

### 1.3.- *Metabolismo mitocondrial en células de cáncer*

Las observaciones en levadura y musculo por parte de Louis Pasteur, Otto Meyerhof y Archibald Hill, establecieron los fundamentos del consumo de la glucosa mediado por la disponibilidad de oxígeno. En presencia de oxígeno, la respiración desempeña un papel predominante en la transformación de la glucosa a piruvato y su oxidación subsecuente en la mitocondria por el ciclo de Krebs; mientras que, en condiciones anaeróbicas, la glucólisis es la principal vía de consumo de glucosa, con la producción de lactato como metabolito final (Otto 2016, Tanner et al., 2018).

Otto Warburg observó en tumores que, en condiciones aeróbicas, el flujo glucolítico y la síntesis de lactato estaban incrementados; fenómeno conocido ahora como “Efecto Warburg”. (Warburg, et al., 1927, Warburg, 1956; Valle y Soto, 2014). En estas primeras observaciones se estableció que las células tumorales mantienen una programación metabólica diferente a las células normales, asumiendo una aparente disfunción mitocondrial (Zu y Guppy, 2004, DeBerardinis y Chandel, 2016; Fan et al., 2014; Vander y DeBerardinis, 2017; Zong et al., 2016; Spinelli, 2017). Lo anterior provocó que el análisis de la función mitocondrial en el cáncer fuera ignorado hasta mediados de los 90. Actualmente, el estudio del metabolismo energético mitocondrial en tumores ha cobrado relevancia. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha

sido pionero en demostrar que la fosforilación oxidativa provee más del 50% del ATP celular utilizado para sostener los procesos de proliferación y de invasión tumoral en carcinomas humanos de cérvix (HeLa), mama (MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468) y hepatoma de roedor (AS-30D) (Rodríguez-Enríquez et al., 2008, 2010, 2015; Mandujano-Tinoco et al., 2013; Hernández-Reséndiz et al., 2015; Pacheco-Velázquez et al., 2018).

#### *1.4.- Metabolismo de aminoácidos en células cancerosas*

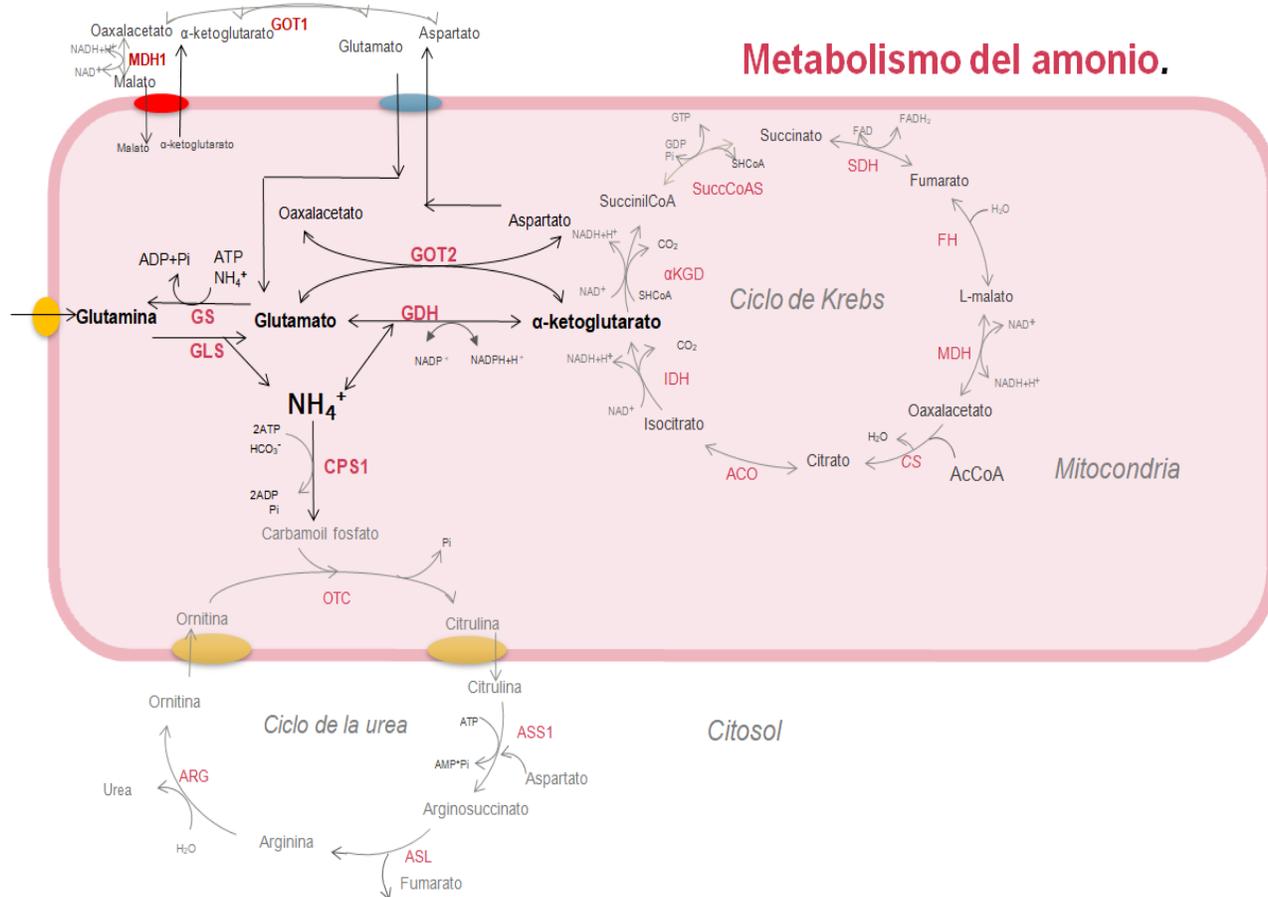
Los cuerpos cetónicos, ácidos grasos y aminoácidos como la glutamina y el glutamato son los metabolitos mitocondriales preferentemente consumidos por las células tumorales (Rodríguez-Enríquez et al., 2000, 2006, 2015). Los aminoácidos contribuyen en la progresión del cáncer dado su papel biosintético y bioenergético (Lieu et al., 2019). El metabolismo de aminoácidos varía notablemente en función del tejido de origen, subtipo de cáncer, microambiente tumoral y mutaciones oncogénicas (Luke et al., 2017).

La glutamina, un aminoácido abundante en el plasma sanguíneo (Cantor J., et al 2017), se metaboliza en el ciclo de Krebs a través de un proceso llamado glutaminólisis cuya función principal es la generación de equivalentes reductores que son oxidados en la cadena transportadora de electrones para la generación de un gradiente de protones utilizado por la *ATP synthase* para la formación de ATP. Además de su papel catabólico, la glutamina proporciona esqueletos de carbono para la síntesis de otros aminoácidos, lípidos, glutatión,  $\alpha$ -ketoglutarato ( $\alpha$ -KG) y nucleótidos; metabolitos de importancia durante la proliferación tumoral. (DeBerardinis et al. 2010., Spinelli et al., 2018., Keshet., et al. 2018, Choi., et al. 2019).

La glutaminólisis es una vía altamente activa en tumores (DeBerardinis., et al 2016, Jin., et al 2016) (Yang et al. 2017). En esta vía, la glutamina entra a la célula por el transportador SLC7A25 o mediante el transportador de aminoácidos neutros SLC1A5 (ASCT2), después ingresa a la mitocondria por una variante del mismo transportador (Keshet., et al. 2018, Stine y Dang., 2020). En la mitocondria, la glutamina es oxidada por la glutaminasa (GLS) para formar glutamato, el cual es metabolizado a  $\alpha$ -ketoglutarato (un intermediario del ciclo de Krebs) (Fig. 4) por la glutamato deshidrogenasa (GDH) o a través de la aspartato aminotransferasa (GOT) (Yang et al., 2017).

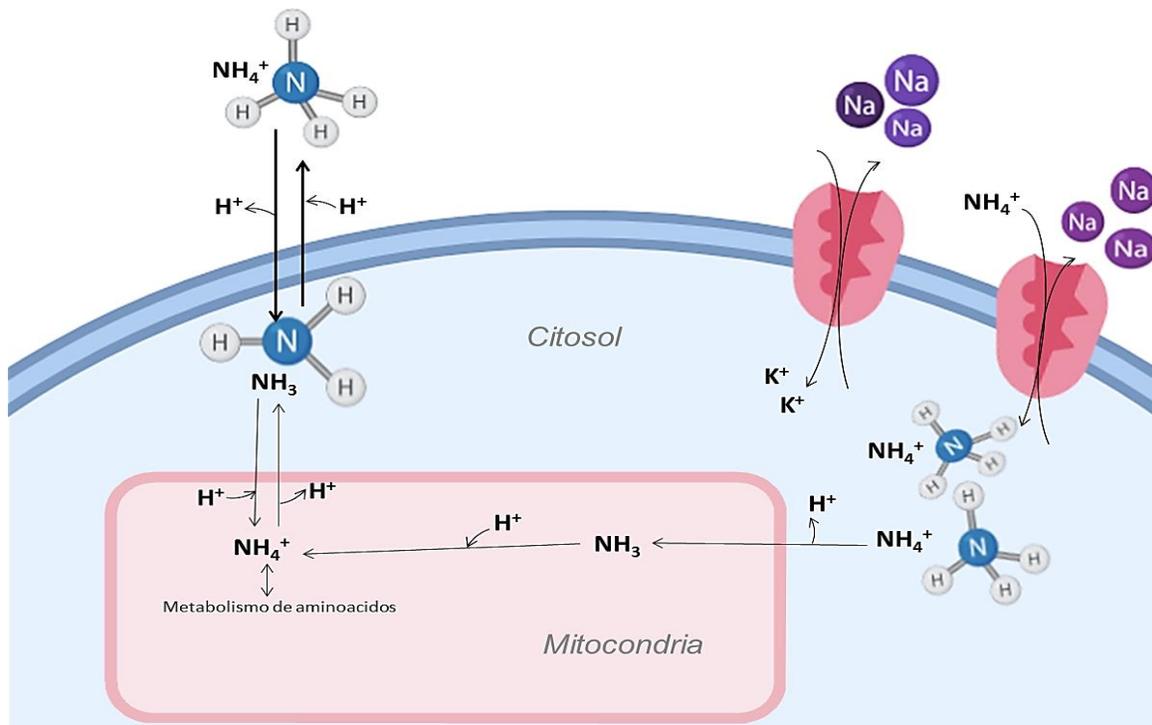
### 1.5.- Metabolismo del amonio.

En el cáncer, las desaminaciones de la glutamina a glutamato por la glutaminasa y de glutamato a 2-oxoglutarato por la GDH proveen de una elevada fuente de  $\text{NH}_4$ . En individuos sanos, las concentraciones fisiológicas de amonio oscilan en el rango micromolar (50-150  $\mu\text{M}$ ). Cuando la concentración de amonio es mayor de 1 mM (hiperammonemia) éste compite con el potasio alterando la función de las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y, en consecuencia, el gradiente electroquímico iónico lo que conlleva a un proceso llamado acidosis metabólica (Martinelle et al. 1993). Para evitar su acumulación intracelular, el amonio debe ser oxidado y transformado a metabolitos de desecho como la urea utilizando enzimas mitocondriales y citosólicas. (Fig. 4.)



**Fig.4. Glutaminólisis y metabolismo del amonio.** La glutaminasa (GLS) oxida glutamato a partir de glutamina el cual es oxidado y desaminado a su vez por la glutamato deshidrogenasa (GDH) a  $\alpha$ -ketoglutarato. La aspartato aminotransferasa (GOT) intercambia el grupo amino entre el glutamato y el oxaloacetato; generando  $\alpha$ -ketoglutarato y aspartato. Ambas desaminaciones producen  $\text{NH}_4$ , que es sustrato de la carbamil fosfato sintetasa 1 (CPS1) en una reacción dependiente de ATP para formar carbamil fosfato, un intermediario del ciclo de la urea (Modificado de Lehninger, A. L, 2013)

La concentración de amonio en el microambiente tumoral de algunas células cancerosas de mama oscila entre 0.14 y 5 mM, mientras que en la sangre de pacientes con cáncer hepático la concentración es de 6-10 mM (Kodama et al., 2015). En contraste, en tejidos sanos y plasma la concentraciones oscilan entre 0-50  $\mu\text{M}$  (Chance et al., 1988; Chance et al., 1989; Gamcsik et al., 1991; Eng et al., 2010 Spinelli et al., 2017). La razón de la elevada concentración en el microambiente tumoral y en la sangre de paciente con cáncer es por el acelerado catabolismo de la glutamina, siendo ésta la principal fuente de producción de amonio. (Reitzer et al., 1979; Segura et al 1989; Cluntun et al., 2017. De Berardinis et al., 2010). la baja difusión de este compuesto favorece su acumulación intracelular, además el amonio compete por el transporte con el potasio en las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Martinelle et al., 1993), siendo otro mecanismo internalización celular en contra del gradiente electroquímico. Por otra parte, en el espacio extracelular la presencia de vasos disfuncionales en el tumor impide su liberación al torrente sanguíneo (Spinelli et al., 2017). (Fig. 5 Modificado de Martinelle et al., 1993).



**Fig. 5. Transporte del amonio en células de mamíferos/**el amonio se transporta al interior de la célula de dos maneras. 1) Por difusión simple, donde se desprotona en función del gradiente electroquímico para ingresar como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) 2) Por transporte activo utilizando la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en competencia por el transporte con el potasio  $\text{K}^+$  debido a la similitud entre los radios iónicos de ambos iones. Sin embargo, la principal fuente de amonio es el metabolismo de aminoácidos. Una vez adentro el amonio puede difundir hacia la mitocondria para ser metabolizado.

## 1.6.- GDH y “asimilación” de amonio.

La célula cancerosa desarrolla estrategias para contender contra la toxicidad del amonio. Recientemente, el estudio de la reacción reversa de la GDH ha cobrado importancia ya que, en algunos tipos de carcinomas de mama, el amonio puede ser utilizado como fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos contribuyendo a la progresión del cáncer.

La GDH es una enzima hexamérica mitocondrial que cataliza la desaminación de glutamato a  $\alpha$ -ketoglutarato y amonio acoplado a la reducción de NAD(P)<sup>+</sup> a NAD(P)H+H. Este dicarboxilato se incorpora al ciclo de Krebs. Además de su rol anaplerótico, la GDH tiene la capacidad de proveer equivalentes reductores en forma de NADPH para el manejo del estrés oxidativo en la matriz mitocondrial (Plaitakis et al., 2017). Estudios iniciales ubicaron a esta enzima en la matriz mitocondrial en hígado y cerebro. Más tarde se detectó actividad en fracciones nucleares de hígado y cerebro de rata e hígado de pollo (Di Prisco et al. 1968, Panda et al., 2011).

En los humanos, existen dos isoformas de GDH, las GDH1 y GDH2 codificadas por los genes GLUD1 y GLUD2, respectivamente. Por microscopia confocal e inmunohistoquímica se ha confirmado la presencia de ambas isoformas en la mitocondria, sin embargo, también se han observado en el núcleo y en menor proporción en el retículo endoplasmático (Mastodermos et al., 2009, Panda et al., 2011). La distribución fisiológica de la isoforma GDH1 se encuentra primordialmente en hígado y glía mientras que la GDH2 está asociada células neuronales, tejido embrionario, testículos y algunos tipos de cáncer (Bunik et al., 2016; Spanki et al., 2016; Spinelli et al., 2017, Takeuchi et al., 2017).

En el 2017, Moreno- Sánchez y colaboradores observaron que la reacción reversa de la GDH se ve favorecida en un hepatoma ascítico de rata (AS-30D); lo que implica la incorporación y asimilación del amonio como una vía anabólica (Tabla 1. Moreno Sánchez et al. 2017). Esto concuerda con lo propuesto anteriormente en 1975 por McGivan y Chappell que, de acuerdo con los parámetros cinéticos y termodinámicos, la reacción reversa se encuentra favorecida en condiciones fisiológicas a pH 7, con una temperatura de 37°C y a concentraciones bajas de amonio encontradas en la sangre (McGivan y Chappell, 1975).

En líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 y T47D), se evaluó la toxicidad del amonio (0.05-50 mM) en medio sin glutamina. Sorprendentemente, este no resultó tóxico; por el contrario, estimuló el crecimiento en esferoides de mama MCF7 (0.4-0.6 veces) y se observó

la síntesis *de novo* de aminoácidos, sugiriendo que el amonio puede ser incorporado para formar aminoácidos como glutamina, glutamato, prolina y aspartato (Tabla 1) tal como se describió por Spinelli et al. (2017). Lo anterior correlacionó con la activación de vías de señalización de AMPK y de mTORC1 inducidas por amonio, lo que conllevó a una activación mitocondrial y en consecuencia a una elevación en la velocidad de proliferación (Tabla 1. Merhi et al., 2017; Lie et al., 2019). El principal mecanismo molecular sugerido para explicar este fenómeno es la potencial utilización de amonio por la GDH en células expuestas a amonio extracelular (Spinelli et al., 2017; Takeuchi et al., 2017; Moreno-Sánchez et al. 2017 y Lie. 2019). Aunque, la expresión o el contenido de proteína total de la GDH no cambia significativamente en células de cáncer (MCF7, T47D, SH-SY5Y, HCT116, HT29, A549, PC3 y HCT116) expuestas a amonio (Tabla 1; Lie. 2019), monitorear los cambios en el contenido de mRNA y proteínas no considera las modificaciones postraduccionales que pueden alterar la función/actividad de la enzima y los mecanismos reguladores que entran en acción, para coordinar las actividades de las proteínas (Moreno-Sánchez et al. 2015). De hecho, algunos carcinomas mamarios no metastásicos como MCF7 y T47D que son capaces de proliferar en condiciones de hiperamonemia (5mM) y en ausencia de glutamina (Spinelli et al., 2017; Takeuchi et al., 2017) tienen un mayor contenido de mRNA de la GDH2 (Takeuchi et al., 2017), interesantemente, la eliminación de la GDH2 por *knockdown* en estas células de cáncer de mama, promovió la incapacidad para proliferar en un medio suplementado con amonio y ausente de glutamina. Por el contrario, se reportó que cánceres con baja capacidad de proliferación en presencia de amonio como el cáncer de próstata PC3 de alta metástasis, requieren de la sobreexpresión de la GDH2 para adquirir la capacidad de proliferación. Lo anterior sugiere que la isoforma 2 de la GDH podría ser la responsable de catalizar la reacción reversa de incorporación de amonio en un proceso parecido a la “asimilación” de amonio ocurrida en plantas (Tabla 1. Takeuchi et al., 2017).

**Tabla 1. Efecto del amonio en la proliferación y metabolismo de células tumorales.**

Tejido/célula	Modelo	Parámetro evaluado	Conclusiones	Referencias
AS-30D Hepatoma, hígado, corazón.	Hepatoma de rata  Mitocondria aislada	IDH, GDH, TH, ME, GR, GPx • Contenido de proteínas (WB) • Parámetros cinéticos (Vmax, Km, Ki) • Cuantificación de metabolitos.	La reacción en reversa de la <b>GDH</b> está favorecida	Moreno-Sánchez et al. 2017)
Carcinoma de mama T47D, MCF7	Esferoides multicelulares de cáncer	• Ensayos de citotoxicidad NH <sub>4</sub> Cl 0.05-50 mM, 48hrs. • Marcaje con [ <sup>15</sup> N]NH <sub>4</sub> Cl, rastreo y abundancia <sup>15</sup> N-isotopólogos, 8 hrs • Crecimiento de esferoides. 0.5mM, 8 días.	<b>El amonio no resulta toxico en ninguna condición</b> ↑ Aminoácidos marcados radioactivamente (0.2-0.5 veces) ↑ Crecimiento (0.4-0.6 veces)	Spinelli et al. 2017
Carcinoma de próstata (PC3), Mama (Hs578T, MCF7, T47D)	Cultivo 2D	• Crecimiento a 3 días en medio DMEM sin glutamina • Proliferación 72 hrs. sin Gln +5 mM NH <sub>4</sub> Cl • Contenido mRNA GDH1 y GDH2 • Síntesis glutamato	<b>-Sólo MCF7 es capaz de proliferar tras suplementación de amonio. -</b> ↑ Proliferación 0.5 veces. ↑ Glutamato 0.7 veces. ↑ <i>GLUD2</i> ; responsable de la producción de glutamato.	Takeuchi et al. 2018
<b>Cancerosa:</b> Médula ósea (SH-SY5Y), Colon (HCT116), HT29, LNCAP, Pulmón (A549), Mama (MCF7, T47D) Hígado (Huh7) <b>No Cancerosas:</b> Mama (MCF10A), Riñón de rata (HEK293)	Cultivo 2D	• Crecimiento a 3 días en tres condiciones: • glutamina 8 mM • NH <sub>4</sub> Cl 0.8 mM sin glutamina • medio sin NH <sub>4</sub> Cl ni glutamina • Contenido de Proteínas (WB): <b>GDH, GS</b>	En NH <sub>4</sub> Cl 0.8 mM sin glutamina LNCAP y MCF10A; NH <sub>4</sub> Cl ↓ viabilidad (20-30%) SH-SY5Y, HCT116, HT29 y A549; no proliferan, viabilidad se mantiene MCF7, T47D, Huh7 y HEK293; ↑ Crecimiento (0.2-6 veces) ↑ GDH, GS 2-7 veces	Lie et a. 2019
Carcinoma de mama, (MCF7)	Cultivo 2D	• Incubaciones largas: Crecimiento a 3 y 5 días, NH <sub>4</sub> Cl 0.1-20 mM, con y sin glutamina (2 mM)  • Incubaciones cortas: NH <sub>4</sub> Cl 5 mM durante 30 minutos. Activación de la vía mTOR	↑ Crecimiento (≈0.2 veces) en las condiciones 2, 3 y 5 mM (glutamina 2 mM) ↓ Crecimiento (20-50%) en las condiciones 10 y 20 mM (glutamina 2 mM) ↑ Crecimiento (1 vez) en las condiciones 2, 3 y 5 mM (sin glutamina) Amonio induce la activación de mTORC1 mediante la vía β1-integrin/FAK/PI3K/mTORC2/AKT	Merhi et al. 2017

Abreviaturas; IDH (Isocitrato Deshidrogenasa), GDH (Glutamato Deshidrogenasa), TH (Tirosina Hidroxilasa), GR (Glutación Reductasa), GPx (Glutación Peroxidasa), GS (Glutamina Sintetasa)

## **2.- Justificación.**

El amonio es un metabolito útil para la progresión tumoral en diferentes células cancerosas. La GDH tumoral es la enzima responsable de la incorporación de este metabolito tóxico como fuente de nitrógeno, Entender las respuestas diferenciales de las células cancerosas nos permitirá dilucidar los mecanismos de regulación metabólica al estrés del microambiente tumoral.

## **3.- Hipótesis.**

El amonio promueve la proliferación de células tumorales de alta capacidad metastásica de origen de próstata y colon a través de la activación de la GDH.

**4.- Objetivo General.** Determinar el efecto del amonio sobre la proliferación celular, el contenido de proteína y actividad de la GDH en líneas celulares metastásicas de humano PC3, HCT116 y COLO205, en contraste de células no-metastásicas DU145.

### **Objetivos Particulares.**

- Identificar la condición óptima de proliferación celular en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en presencia y ausencia de glutamina.
- Evaluar el contenido de proteína de la GDH1/2 por Western Blot.
- Determinar la velocidad máxima reversa ( $V_{\text{max rev}}$ ) de la GDH por un ensayo acoplado a la generación de NADPH+H.

## 5.- Metodología.

### 5.1 Modelos de Estudio.

Se emplearon líneas metastásicas tumorales de próstata y colon genotipificadas por la ATCC. Para las correspondientes a cáncer de próstata se utilizaron las líneas celulares de grado IV con morfología epitelial adherente; PC3 proveniente de un sitio metastásico de hueso y DU145 proveniente de un sitio metastásico de cerebro (*American Type Culture Collection*, 2019). En cáncer de próstata se ha observado que la pérdida del gen de la tirosina fosfatasa (PTEN) promueve la actividad y cascada de señalización del receptor de quimioquinas 4 (CXCR4) por el factor inducible de células estromales (SDF1 $\alpha$ ), asociados a la progresión tumoral y metástasis por la transición epitelio-mesénquima (Mahandranauth et al., 2010). PC3 no expresa PTEN y posee un alto potencial metastásico; sin embargo, DU145 expresa PTEN *wildtype* y aunque es capaz de migrar tiene capacidad baja, por lo que podría considerarse de baja metástasis (Mahandranauth et al., 2010).

En el caso de las líneas celulares metastásicas de colon se utilizó la línea celular HCT116 grado IV de morfología epitelial, adherente y COLO205 en estadio Dukes Type D (Grado IV) de morfología mixta; epitelial adherente y en suspensión, proveniente de un sitio metastásico de ascitis. (*American Type Culture Collection*, 2019) ambas con potencial de migración a pulmones e hígado. (Ehrig, 2013).

Como control se evaluaron las líneas celulares no cancerosas, fibroblastos de ratón 3T3 y fibroblasto de piel humana BJ. También se incluyó en este análisis la línea celular de fibroblastos de riñón HEK293 el cual posee un cariotipo aberrante e inestabilidad cromosómica, que ocasionan que su transcriptoma se desregule severamente (Stepanenko y Dmitrenko, 2015). Se ha reportado que esta línea celular, a pesar de no ser cancerosa, posee un elevado potencial tumoral (Chao et al. 2018) por lo que HEK293 es considerada una línea celular *Tumor like*.

### 5.2.- Cultivo celular.

Las líneas celulares tumorales de próstata (PC-3 y DU145) y colon (HCT116 y COLO 205) se incubaron en medio DMEM (*Dubleccó's modified Eagle's medium*) con 25 mM de glucosa, 4 mM de glutamina, 10% de suero fetal bovino, 200 u/ml de penicilina y 200  $\mu$ g/ml de estreptomina en condiciones de incubación a 37° y 5% CO<sub>2</sub>. (Rodríguez-Enríquez et al., 2010). Al observar coloración naranja-amarilla del medio por su acidificación, se lavaban con

buffer de fosfatos salino PBS (por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) y se cambiaba el medio continuamente hasta obtener una confluencia del 80-90% para su uso.

### 5.3.- *Curvas de Crecimiento.*

En cajas de 96 pozos se sembraron 10,000 células por cada pozo las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de 0, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10mM de NH<sub>4</sub>Cl en medio DMEM con y sin glutamina y se realizó un conteo diario por medio de la cámara de Neubauer. De los conteos se obtuvieron los tiempos de duplicación y la tasa de crecimiento específica. El tiempo de duplicación se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$n = \frac{1}{[3.32(\log N_F - \log N_I)] / (t_F - t_I)}$$
; donde NF representa el número de células cultivadas al final de la fase de crecimiento exponencial; NI representa el número de células al comienzo de la curva de crecimiento; tF es el tiempo final en el que se recolectaron las células y tI es el tiempo de cultivo inicial.

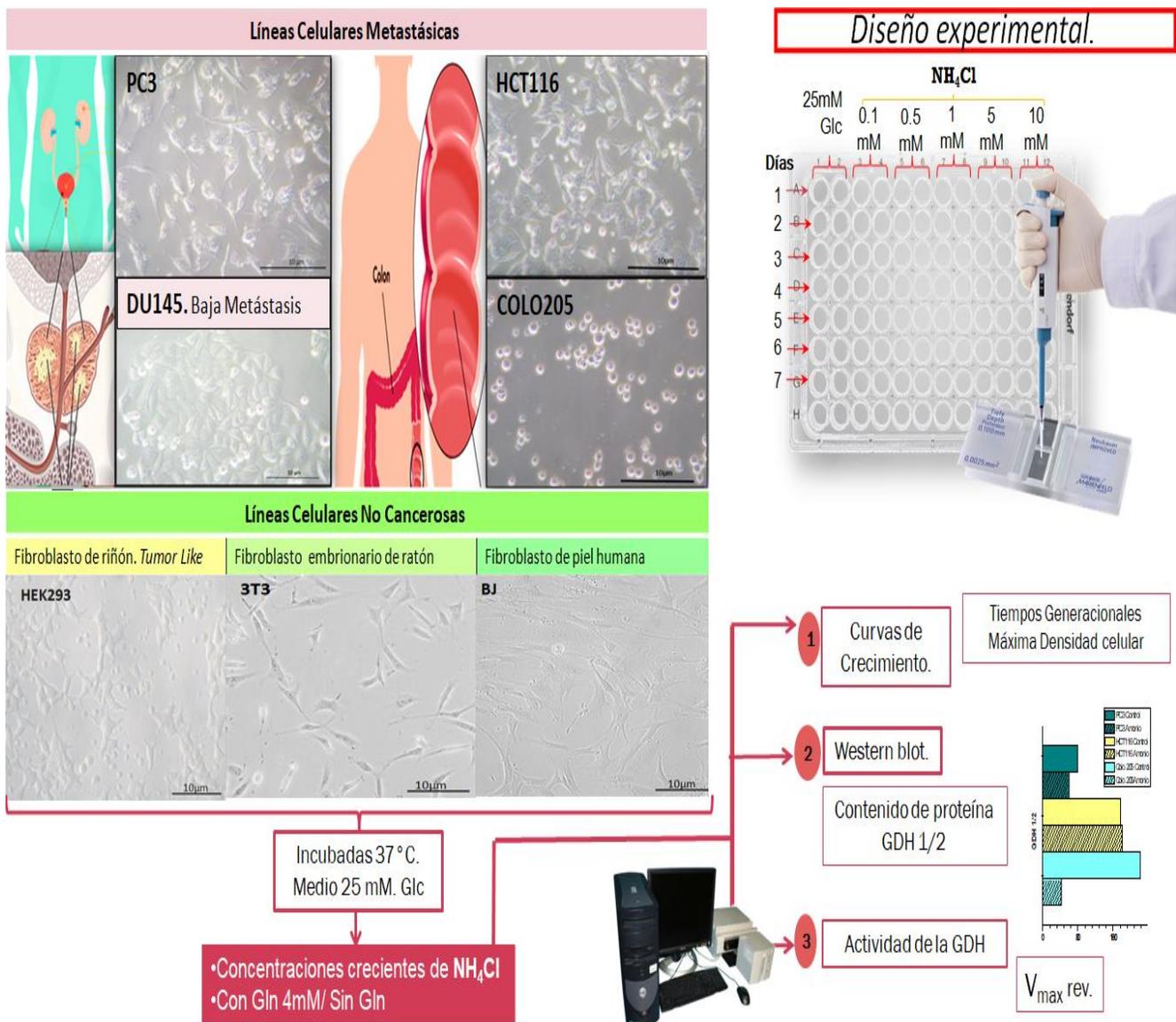
La tasa de crecimiento específica ( $\mu(h^{-1})$ ) se calculó a partir de la pendiente de un gráfico semilogarítmico de densidades celulares en la fase de crecimiento exponencial frente al tiempo. (McAtter y Davis, 1994).

### 5.4.- *Western blot (WB).*

Las células se lavaron con buffer de fosfatos (PBS), se desprendieron por raspado y centrifugaron a 2600 rpm/3 minutos. El botón celular se mezcló en 250  $\mu$ l de amortiguador de Tris (Tris-HCl 25mM pH 7.6 con DTT 5mM, EDTA 1mM y PMSF 1mM) se rompieron mediante presión mecánica. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm/30 minutos. Se cuantificó el contenido de proteína por el método de Lowry. Para el ensayo de WB se cargaron 50  $\mu$ g de proteína en un gel de SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida y se electrotransfirieron a membranas de PVDF (BioRad; Hercules, CA, USA). Posteriormente las membranas se incubaron con un anticuerpo humano monoclonal (Santa Cruz; CA, USA, dilución 1:1000) específico para la GDH. Las bandas de hibridación se revelaron con su anticuerpo secundario mouse conjugado a peroxidasa de rábano y se detectó la señal de la proteína con el sistema ECL-plus (Amersham; Buckinghamshire, UK). El análisis densitométrico se realizó con el software Scion Image (ScionCorp; Frederic, MD, USA). Cada banda se normalizó con respecto a un control de carga, de 100%. (Rodríguez-Enríquez et al., 2010.)

### 5.5.- Actividad enzimática.

El ensayo de actividad de GDH se realizó a 37° en buffer KME a pH 7, en presencia de 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% Triton X-100, 0-2.4 mM ADP, 0-0.75 mM 2-OG, 0.15-0.2 mM NADPH y 50-100 mg de proteína. La reacción específica de la GDH se inició mediante la adición de NH<sub>4</sub>Cl 5-100 mM. Se siguió la disminución de la absorbancia a 340 nm durante varios minutos para permitir el desarrollo completo del comportamiento de histéresis enzimática (Moreno-Sánchez et al. 2017). Para el cálculo de la velocidad máxima se consideró la pendiente de la absorbancia con respecto al tiempo en su región lineal, el coeficiente de extinción molar del NADPH (340nm) y el volumen de la celda.



**Fig. 6. Diseño experimental.** Abreviaturas: Glc (Glucosa), Gln (Glutamina), GDH 1/2 (Glutamato Deshidrogenasa),  $V_{max\ rev}$  (Velocidad máxima reversa.)

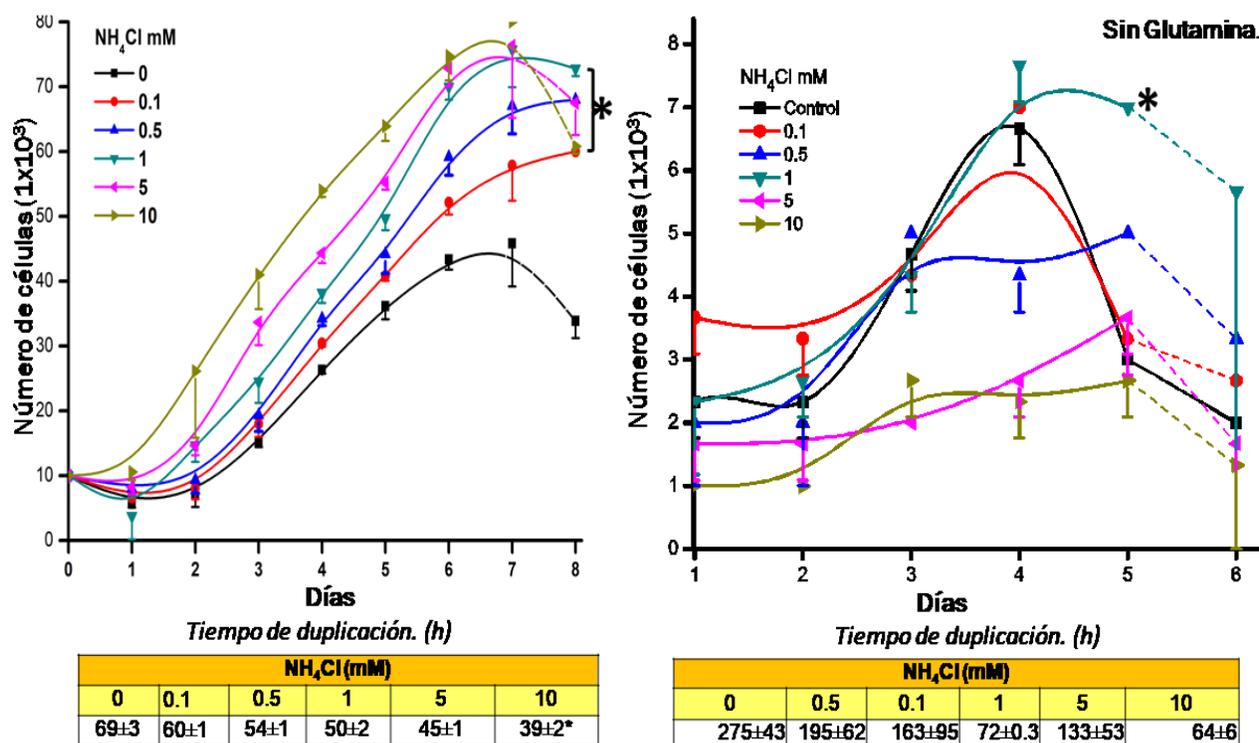
## 6.- Resultados.

### 6.1.- Curvas de Crecimiento

#### 6.1.1 Líneas celulares Cancerosas.

##### PC3 (Línea Celular Metastásica).

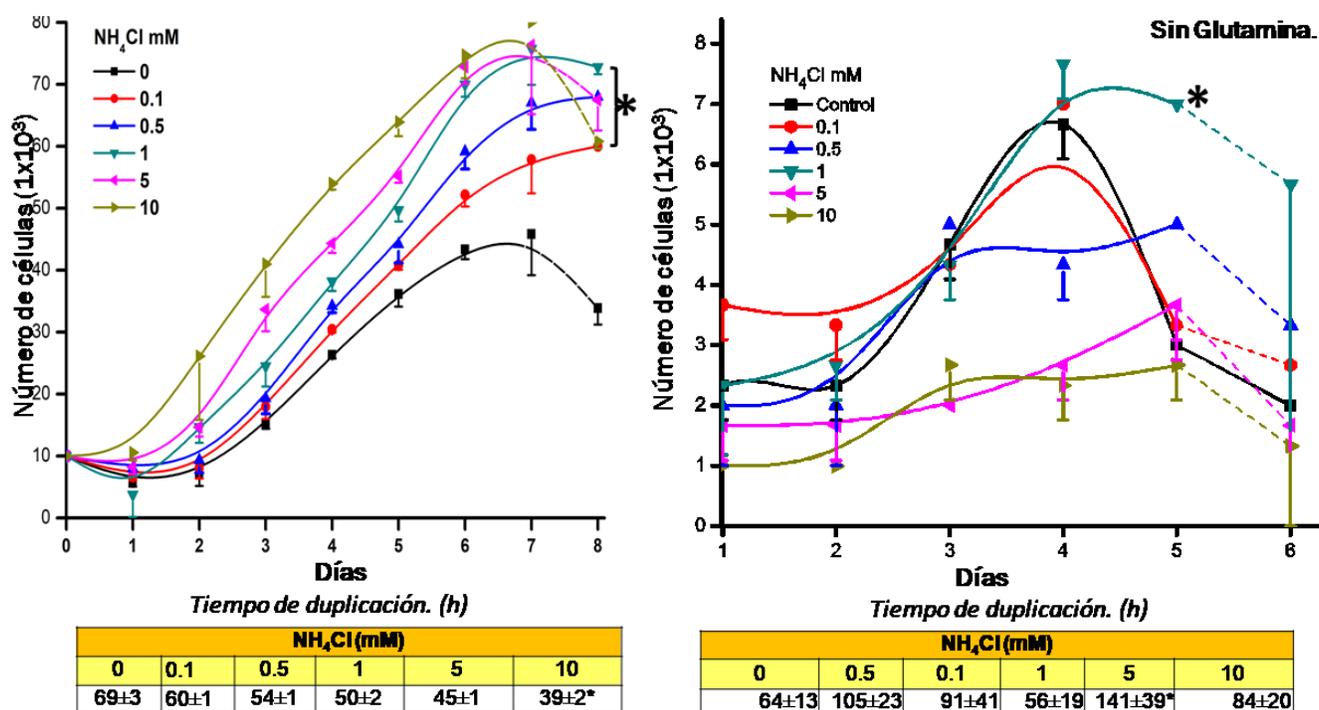
El amonio estimuló la proliferación de PC3 hasta la máxima concentración evaluada de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sin resultar toxico, disminuyendo progresivamente los tiempos de duplicación con una diferencia contrastante de 10 horas entre la condición control y la máxima concentración evaluada. Sin embargo, al día 5 de la curva de crecimiento comienza un declive en la densidad celular. Cuando la glutamina se depleta la proliferación celular decae incluso en la condición control; la suplementación de 1 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solo al día 5 aumenta ligeramente la proliferación con respecto al control, mientras que concentraciones menores a 1 mM no rescatan ni estimula la proliferación y concentraciones mayores a 1 mM resultan negativas, aumentando los tiempos de duplicación (Figura 7).



**Fig. 7** Efecto de la suplementación con amonio sobre la línea celular PC3 en presencia y ausencia de glutamina. Arriba; Una densidad celular ( $10 \times 10^3$  células/pozo) se incubaron en cajas de 96 pozos a concentraciones crecientes 0 (■), 0.1 (●), 0.5 (●), 1 (▲), 5 (◆) y 10 (▼) mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El índice de proliferación fue monitoreado cada 24 hrs. mediante el conteo de la densidad celular. Viabilidad >90% en todas las condiciones. Abajo, Tablas de tiempo de duplicación (h). Los datos muestran la media  $\pm$  DE de al menos tres repeticiones. Análisis estadístico por ANOVA con prueba de comparación Scheffe. \* $P < 0.05$  vs. Control.

## HCT116. (Línea Celular Metastásica)

El amonio de igual manera estimuló la proliferación de la línea celular metastasica de cancer de colon HCT116 en todas las concentraciones evaluadas sin resultar toxico; decrementando el tiempo de duplicación con una diferencia de hasta 31 horas entre la maxima concentración evaluada de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en comparación con el control sin amonio. Durante la depleción de la glutamina la densidad celular decae en todas las condiciones evaluadas en los primeros días y sólo comienzan a proliferar a partir del día 2. Las concentraciones de 0.1 y 0.5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no estimularon la proliferación en comparación del control, la condición de 1 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  incrementó ligeramente la densidad celular al día 5 en comparación con el control y concentraciones de 5 y 10 mM resultaron demasiado agresivas aumentando los tiempos de duplicación con una diferencia contrastante de 20 horas entre la máxima concentración evaluada y el control (Fig. 8).



**Fig. 8. Efecto de la suplementación con amonio sobre la línea celular HCT116 en presencia y ausencia de glutamina.** Arriba; Una densidad celular ( $10 \times 10^3$  células/pozo) se incubaron en cajas de 96 pozos a concentraciones crecientes 0 (■), 0.1 (●), 0.5 (●), 1 (▲), 5 (◆) y 10 (▼) mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El índice de proliferación fue monitoreado cada 24 hrs. mediante el conteo de la densidad celular. Viabilidad >90% en todas las condiciones. Abajo, Tablas de tiempo de duplicación (h). Los datos muestran la media  $\pm$  DE de al menos tres repeticiones. Análisis estadístico por ANOVA con prueba de comparación Scheffe. \* $P < 0.05$  vs. Control.

### Colo 205 (Línea Celular Metastásica).

La proliferación de Colo 205 se ve favorecida en todas las concentraciones evaluadas de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sin resultar tóxico, decrementando el tiempo de duplicación con una diferencia de hasta 8 horas entre el control y la concentración de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Sin embargo, la densidad celular decae primero en esta condición al día 4 de la curva de crecimiento. Se obtuvo una densidad celular mayor del 20% en las concentraciones de 1 y 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al quinto día. Por otra parte, al depletar la glutamina del medio la densidad celular decrece; iniciando la proliferación al segundo día, Interestingly, concentraciones hasta 5 mM estimularon y rescataron parcialmente la proliferación de manera significativa con respecto al control (se observó el doble de densidad celular en la concentración de 5 mM al quinto día de la curva de crecimiento con respecto al control). Aunque; la máxima concentración (10 mM) resultó demasiado agresiva; frenando la proliferación e incrementando el tiempo de duplicación (Fig. 9).

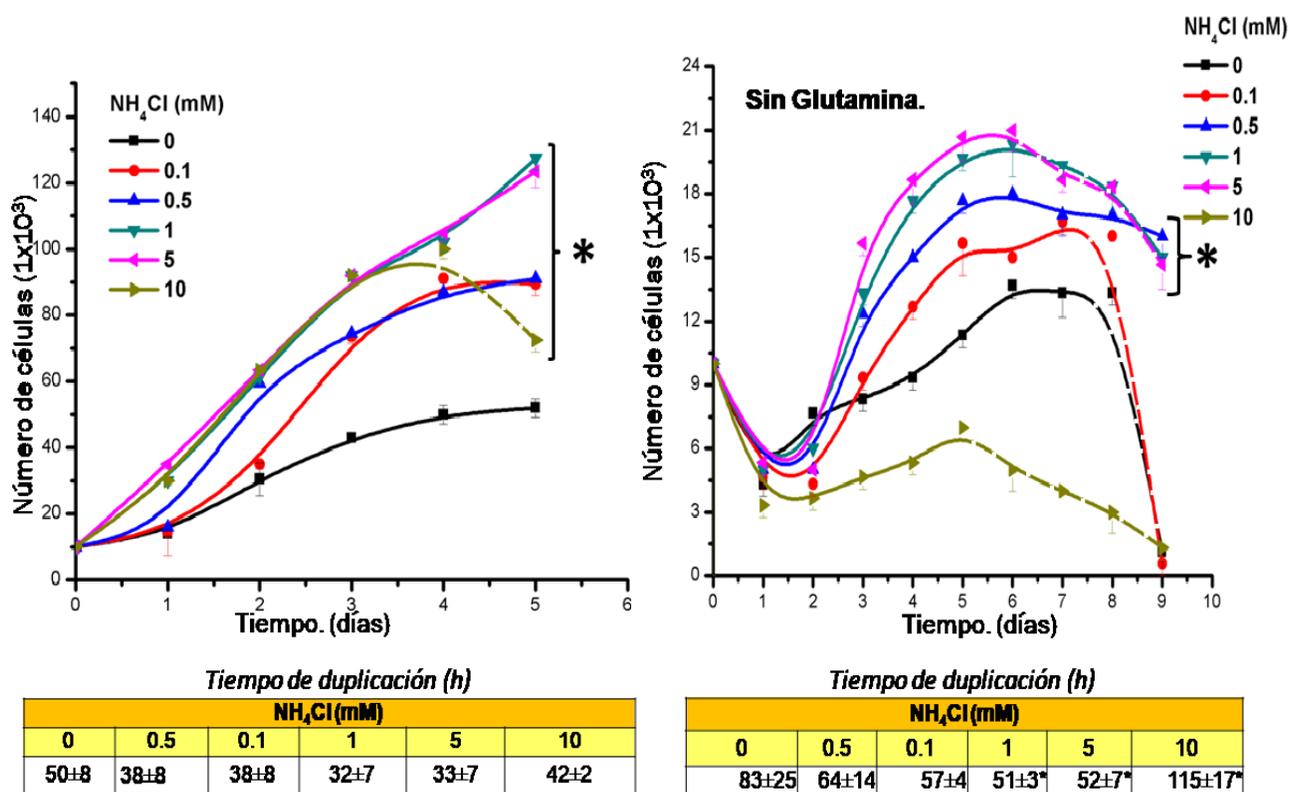


Fig. 9. Efecto de la suplementación con amonio sobre la línea celular COLO205 en presencia y ausencia de glutamina. Arriba; Una densidad celular ( $10 \times 10^3$  células/pozo) se incubaron en cajas de 96 pozos a concentraciones crecientes 0 (■), 0.1 (●), 0.5 (●), 1 (▲), 5 (◆) y 10 (▼) mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El índice de proliferación fue monitoreado cada 24 hrs. mediante el conteo de la densidad celular. Viabilidad >90% en todas las condiciones. Abajo, Tablas de tiempo de duplicación (h). Los datos muestran la media  $\pm$  DE de al menos tres repeticiones. Análisis estadístico por ANOVA con prueba de comparación Scheffe. \* $P < 0.05$  vs. Control.

## DU145. (Baja metástasis)

En el caso de la línea celular de baja metástasis de cáncer de próstata DU145 la suplementación de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en concentraciones menores 1 mM estimulan la proliferación con una densidad celular significativamente mayor en comparación al control al día 5 de la curva de crecimiento. Sin embargo, concentraciones mayores a 1 mM resultaron tóxicas, incrementando el tiempo de duplicación abatiendo la proliferación decayendo la densidad celular al día 4 de la curva de crecimiento (Fig. 10).

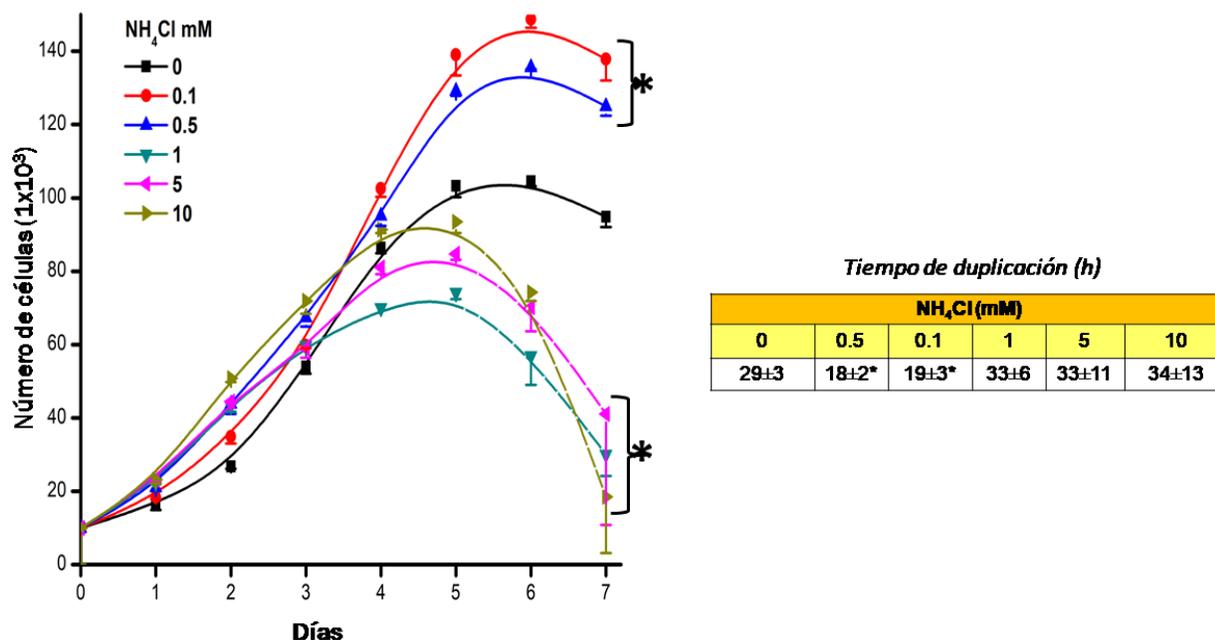


Fig. 10 Efecto de la suplementación con amonio en la línea celular DU145 en presencia de glutamina. Las células ( $10 \times 10^3$  células/pozo) se incubaron en cajas de 96 pozos a concentraciones crecientes 0 (■), 0.1 (●), 0.5 (●), 1 (▲), 5 (◆) y 10 (▼) mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La proliferación se monitorea cada 24 hrs. por el conteo de la densidad celular. Viabilidad >90% en todas las condiciones. Tablas de tiempo de duplicación (h). Los datos muestran la media  $\pm$  DE de al menos tres repeticiones. Análisis estadístico por ANOVA con prueba de comparación Scheffe. \* $P < 0.05$  vs. Control.

### 6.1.2.- Líneas Celulares No Cancerosas.

La suplementación de amonio en la línea celular de fibroblastos de riñón HEK293 a concentraciones de 0.1 y 0.5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no fue toxica; aunque no presentó diferencias con el control (no se estimuló la proliferación). Por otra parte, concentraciones mayores a 1 mM resultaron toxicas, aumentando el tiempo de duplicación; decreciendo la densidad celular. En cuanto a las líneas celulares de fibroblastos de ratón y piel humana 3T3 y BJ el aumentó el tiempo de duplicación al incrementar este metabolito (Fig. 11).

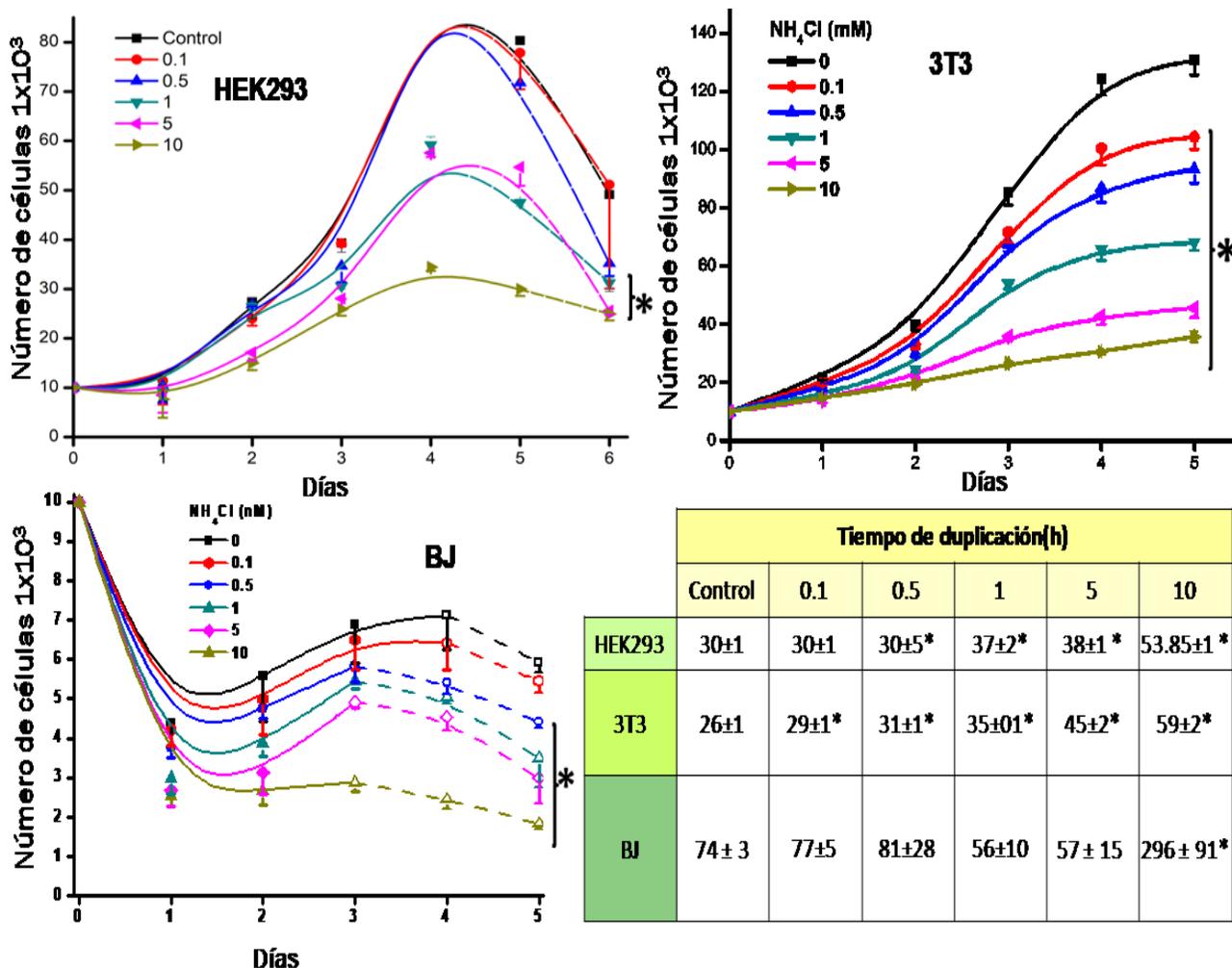


Fig. 11. Efecto de la suplementación con amonio en Células No Cancerosas en presencia de glutamina. HEK293 (Fibroblastos de riñón humano), 3T3 (Fibroblastos de ratón) y BJ (fibroblasto de piel humana) ( $10 \times 10^3$  células/pozo) se incubaron en cajas de 96 pozos a concentraciones crecientes 0 (■), 0.1 (●), 0.5 (●), 1 (▲), 5 (◆) y 10 (▼) mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La proliferación se monitoreo cada 24 hrs. por el conteo de la densidad celular. Viabilidad >90% en todas las condiciones. Tablas de tiempo de duplicación (h) y máxima densidad celular obtenida ( $\times 10^3$ ). Los datos muestran la media  $\pm$  DE de al menos tres repeticiones. Análisis estadístico por ANOVA con prueba de comparación Scheffe. \* $P < 0.01$  vs. 1, 5, o 10 mM  $\text{NH}_4^+$ .

El comportamiento de la dosis-respuesta al amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) por parte de estas líneas celulares puede analizarse a través de la velocidad de duplicación en función de la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fig. 12). La línea celular metastásica de cáncer de próstata PC3 presentó la mejor respuesta a la suplementación de amonio; aumentando su duplicación, con la mayor velocidad a 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Un fenómeno similar ocurre en las líneas celulares metastásicas de cáncer de colon. En HCT116 se observa que el amonio estimuló la proliferación a concentraciones de 5 mM y 10 mM. Por su parte, Colo 205 incrementó su duplicación desde 0.5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Interessantemente, en la línea celular cáncer de próstata de baja metástasis DU145 incrementó su duplicación a concentraciones menores a 1 mM y concentraciones mayores disminuyeron la proliferación. Las líneas celulares no cancerosas HEK293, 3T3 y BJ disminuyen su índice de duplicación celular en función de la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fig. 11).

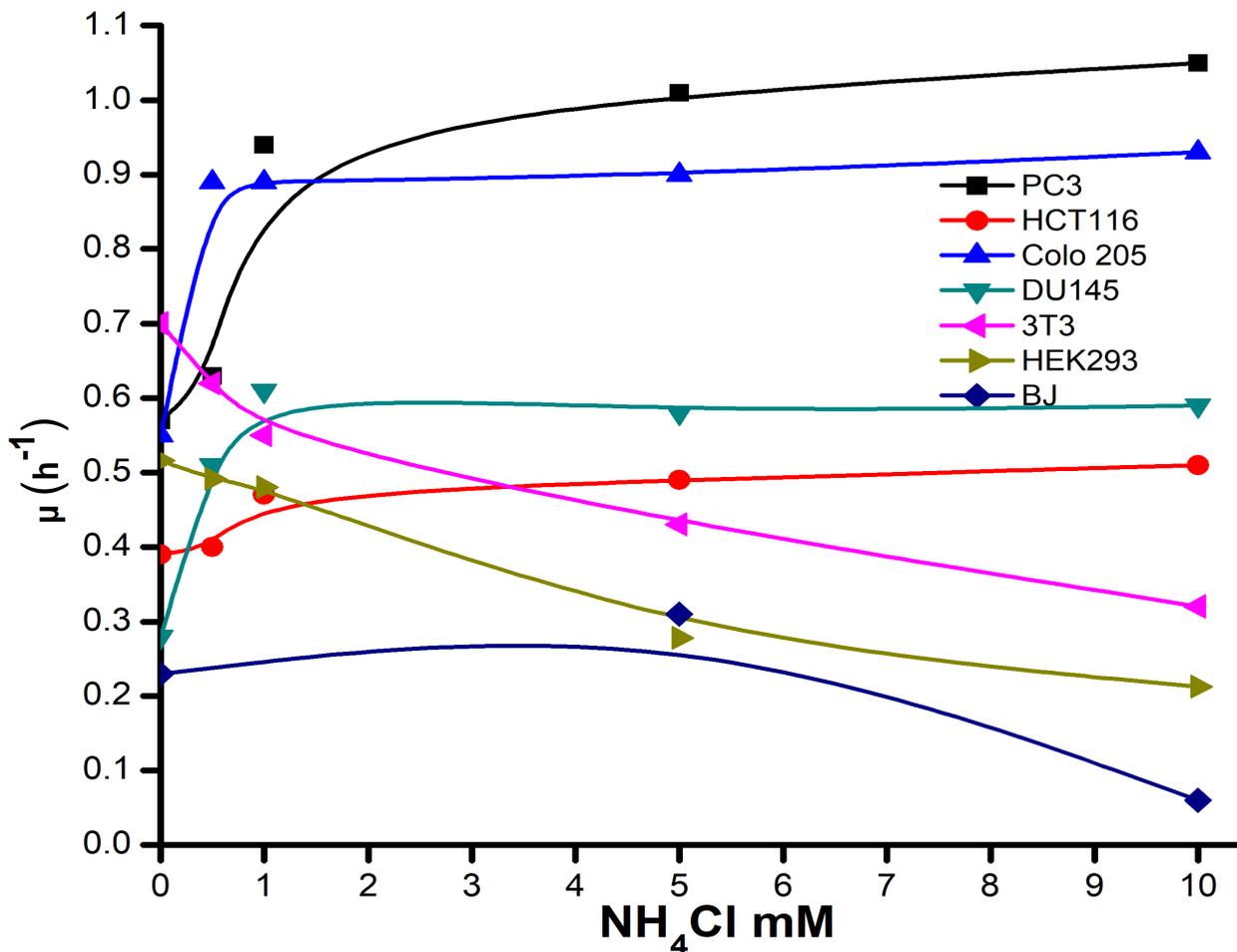


Fig. 12 **Gráfica de Comportamiento Dosis-Respuesta.** Velocidad de duplicación [ $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ )] de las Líneas Celulares Cancerosas PC3, HCT116 y Colo 205 (Alta metástasis), DU145 (Baja metástasis) y No Cancerosas HEK293 (*Tumor like*), 3T3 y BJ en función de la concentración mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

En resumen, se evaluó el efecto de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a concentraciones crecientes (0.1, 0.5, 1,5 y 10 mM) sobre las líneas celulares metastásicas (PC3, COLO205 y HCT116). El amonio estimuló proliferación de las líneas celulares de alta metástasis de próstata PC3 y colon HCT116 y Colo205, decreciendo significativamente los tiempos de duplicación entre 8-30 horas entre la máxima concentración evaluada de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sin efectos tóxicos. DU145 presento una doble respuesta; concentraciones menores de 1 mM estimularon la proliferación con una densidad celular significativamente mayor en las condiciones de 0.1 y 0.5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Sin embargo, concentraciones mayores a 1mM resultaron toxicas, incrementando los tiempos de duplicación hasta 10 horas entre la condición de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y el control sin suplementar. Durante la depleción de glutamina del medio las células cancerosas no son capaces de proliferar. Únicamente células COLO 205 poseen capacidad de rescatar parcialmente la proliferación en presencia de hasta 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Tabla 2).

En las células no cancerosas de fibroblasto de riñón HEK293-*tumor like*, fibroblasto de ratón 3T3 y fibroblasto de piel humana BJ la suplementación con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no promueve la proliferación, resulta tóxico e incrementa los tiempos de duplicación (Tabla 2).

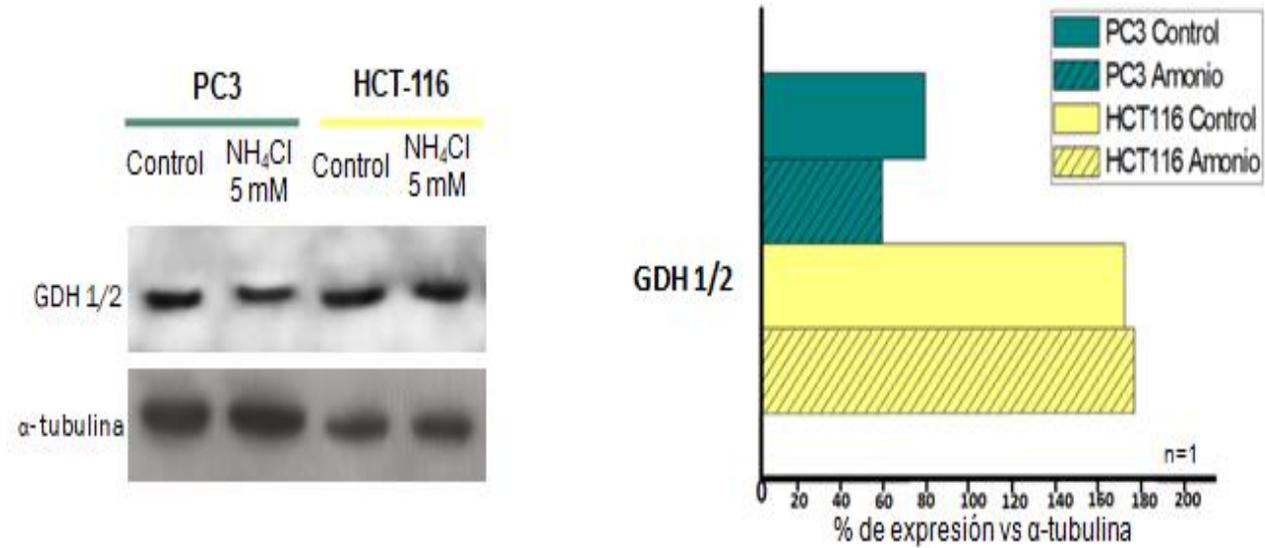
A pesar de que la las líneas de alta metástasis presentan una mayor densidad celular en la máxima condición de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , en esta condición decae la densidad celular anticipadamente después del día 4 de la curva de crecimiento; en el caso de Colo 205 se observa un incremento del 20% en la condición de 1 y 5 mM en comparación con la concentración de 10 mM (Tabla 2) por lo que se estableció 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 5 días de cultivo como la condición óptima para la generación de los extractos celulares y su posterior evaluación del contenido de proteína y actividad de la GDH.

	Tiempo de duplicación (h)			$\mu$ (h <sup>-1</sup> )			Máxima densidad celular (no. de células x10 <sup>3</sup> )		
	Control	+ 5 mM NH <sub>4</sub> Cl	+ 10 mM NH <sub>4</sub> Cl	Control	+ 5 mM NH <sub>4</sub> Cl	+ 10 mM NH <sub>4</sub> Cl	Control	+ 5 mM NH <sub>4</sub> Cl	+ 10 mM NH <sub>4</sub> Cl
<b>Alta metástasis</b>									
<b>PC3</b>	36±2	28±2*	26±1*	0.57±0.06	1.01±0.04*	1.05±0.03*	68±3.5	136±2*	141±1.4*
<b>HCT116</b>	69±3	45±1*	39±2*	0.36± 0.05	0.49±0.03*	0.51±0.02*	45±7	76±11*	80±13*
<b>Colo 205</b>	50±1.66	33±0.5	42±1.03	0.55±0.08	0.92±0.01*	0.93±0.04*	76±1.4	127±5*	102±3*
<b>Baja metástasis</b>									
<b>DU145</b>	26±2	32±2*	35±3*	1.0±0.06	0.47±0.07*	0.55±0.04*	106±8	92±6 *	85±4*
<b>Tumor Like</b>									
<b>HEK293</b>	30±1	38±1 *	53.85±1 *	0.50±0.06	0.27±0.04	0.20±0.04	90±2	57±1*	35±3*
<b>No cancerosas</b>									
<b>3T3</b>	26.4±0.5	30±0.8	59±1.4	0.70±0.02	0.43±0.008	0.32±0.03	135±5	48±3*	37±2*
<b>BJ</b>	74 ± 3	57 ± 15	296 ± 91*	0.22±0.01	0.31±0.08	0.06±0.02	7± 1	5± 0.4*	3+ 0.3*

**Tabla 2. Efecto de la suplementación con amonio en la proliferación celular.** Los datos muestran la media ± DE de al menos tres repeticiones. Análisis estadístico por ANOVA con post hoc Tukey. \*P<0.05. La máxima densidad celular fue alcanzada al día 4 en PC3 HEK293, 3T3 y BJ, para DU145 al día 5, Colo 205 al día 6 y para HCT116 al día 7.

## 6.2.- Contenido de proteína GDH.

El contenido de proteína total de la GDH, de las células metastásicas de próstata y colon, no presentó diferencias entre el control sin amonio y las la expuestas a 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 4 días en comparación con las células control sin añadir  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .



**Fig. 13 Contenido de proteína total de la GDH 1/2.** Se tomaron las células después de 4 días de cultivo (final de la fase exponencial) suplementadas con 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y el control sin suplementar, se realizó la comparación densitométrica del bandaje obtenido vs tubulina.

### 6.3.- Actividad Enzimática GDH. ( $V_{maxrev}$ )

El contenido de proteína no siempre es un reflejo de la actividad de la enzima o de la función, por lo que el análisis cinético en equilibrio rápido nos permite un mejor análisis de la funcionalidad de una enzima (Moreno-Sánchez, et al. 2015). Con esto en mente, se midió la actividad ( $V_{maxrev}$ ) de la GDH de las líneas celulares. Las células expuestas a 5mM de  $NH_4Cl$  durante 4 días presentaron una actividad de 0.2 a 3 veces mayor en comparación con las células sin suplementar.

	Control		5mM $NH_4Cl$	
Líneas celulares	GDH $V_{maxrev}$ .	%	GDH $V_{maxrev}$ .	% Cambio
PC3	10	100	13	↑30%
HCT116	2	100	6	↑2veces
Colo205	9	100	15	↑66%
DU145	15±4	100	13±3	↓13%

**Tabla 3 Actividades enzimáticas** de las líneas celulares de alta metástasis (PC3, HCT116 y COLO205) y baja metástasis (DU145). Incubadas durante 5 días en presencia de 5 mM de  $NH_4Cl$  y el control sin suplementar. n=2-3 los datos muestran la media ± DE.

PC3 presento un incremento de 0.2 veces (20%) en la actividad de las células expuestas a 5 mM de  $NH_4Cl$ , HCT 116 presento un incremento de 2 veces (200%); siendo el mayor incremento en la actividad comparado con el control. Colo 205 presentó la mayor actividad en las células expuestas a  $NH_4Cl$  con una  $V_{maxrev}$  de 15 nmol/min\*mg prot. Cabe destacar y recordar que COLO205 fue capaz de rescatar la proliferación en ausencia de glutamina (Fig.9).

## 7.- Discusión

7.1 El amonio estimula la proliferación de células cancerosas altamente metastásicas.

El amonio (10 mM) estimuló la proliferación de diferentes carcinomas altamente metastásicos como son próstata (PC3) y colon (HCT116 y Colo 205) en un medio básico que contiene glutamina 4 mM por el contrario, cánceres con un perfil de baja metástasis como próstata DU145, concentraciones mayores a 1mM de amonio disminuyeron su capacidad proliferativa, como se había reportado anteriormente en presencia de amonio (0.5-0.8mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) para otras líneas celulares de cáncer de baja metástasis, como neuroblastoma (SH-SY5Y), adenocarcinoma de colon (HT29), pulmón (A549) (Takeuchi et al., 2018, Lie et al. 2019). De manera contrastante en DU145, concentraciones bajas de 0.1 y 0.5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lograron estimular su proliferación.

Por otra parte, Takeuchi (2018) y Lie (2019) también reportaron que las líneas de alta metástasis PC3 y HCT116 no eran capaces de proliferar y utilizar el amonio (0.5-0.8mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) como fuente de nitrógeno, ya que no se estimulaba la proliferación en ausencia de glutamina.

Sin embargo, el efecto del amonio sobre el crecimiento de células cancerosas no ha sido profundamente analizado en la literatura. Spinelli (2017) documentó que el amonio a baja concentración (0.5-0.8mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y en ausencia de glutamina, estimula la proliferación de las líneas de cáncer de mama de baja metástasis MCF7 y T47D donde se expresa primordialmente la GDH2. Esta misma concentración de amonio no afectó el crecimiento de otras líneas de cáncer como PC3 y HCT116 aparentemente porque la expresión de la GDH2 es menor en estas líneas y predomina la GDH1. En estos estudios, el efecto del amonio en la proliferación se observó solo a las primeras 72 horas de cultivo (Spinelli, et al, 2017, Takeuchi et al., 2018, Lie et al., 2019) Sin observar la densidad final alcanzada y la asíntota del final de la fase exponencial de proliferación. Nosotros reportamos en este trabajo la generación de la fase exponencial hasta las 96 horas de incubación con una caída en la densidad celular en las 24 a 48 h posteriores a la llegada de la fase exponencial.

En este sentido, la condición sin glutamina evaluada en los antecedentes y en este proyecto se empleó como control para forzar a las líneas tumorales a incorporar amonio y así dilucidar el potencial rol anabólico de la GDH. (Spinelli et al. 2017, Takeuchi, et al. 2018, Lie et al. 2019). El aumento en la proliferación de las líneas cancerosas de mama de baja metástasis (MCF7 y T47D) en presencia de amonio se ha propuesto a través de la reacción reversa de la GDH, ya que

promueve la síntesis *de novo* de aminoácidos (Spinelli, et al. 2017) con el amonio como fuente de nitrógeno (8 mM NH<sub>4</sub>Cl) e induciendo la vía de señalización de mTORC1 en MCF7 (Lie et al. 2019).

En este proyecto cuando la glutamina se depleta del medio la densidad celular decrece en todas las condiciones evaluadas de NH<sub>4</sub>Cl. PC3 no es capaz de rescatar la proliferación en ninguna concentración, concordando con lo reportado por Takeuchi y (2018) y Lie (2019). Interesantemente se observó que HCT116 rescató parcialmente la proliferación al día 4 de la curva de crecimiento en la condición de 1mM. Interesantemente COLO205 rescató parcialmente la proliferación hasta una concentración de 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl con el doble de densidad celular al día 4 de la curva de crecimiento en comparación con el control, previamente solo se tenía conocimiento de que MCF7 y T47D eran capaces de proliferar en condiciones sin glutamina (Spinelli et al. 2017).

A pesar de ello la ausencia de glutamina no es fisiológica, ni fisiopatológica y podría subestimarse la capacidad celular de manejo de amonio y el mecanismo incorporación vía GDH. Como hemos presentado y mencionado anteriormente se observa una tendencia clara en el incremento de la proliferación en células metastásicas de cáncer de próstata (PC3) y colon (HCT116 y COLO205) en presencia de glutamina contrastante con los antecedentes y los controles evaluados en ausencia de glutamina (Spinelli et al. 2017, Takeuchi, et al. 2018, Lie et al. 2019). Un dato importante que hay que recordar, es que la glutamina es el aminoácido con mayor presencia en plasma sanguíneo en un rango de 0.5-0.8 mM, incluso alcanzando concentraciones de 20 mM en musculo esquelético (Scriver et al. 1973, Curi et al. 2004 y Cruzat et al. 2018). En este mismo sentido, las celulares tumorales son sensibles a la depleción de este aminoácido desencadenando otros procesos de regulación como la inducción de autofagia por macropinocitosis a través de TFEB (Factor de transcripción EB) que se transloca al núcleo; de manera independiente a las cinasas serin/trioninas ULK1/ULK2 (Por sus siglas en inglés Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1-2) (DeBerardinis et al. 2010, Hensley et al. 2013 y Cluntun et al. 2017 y Cruzat et al. 2018, Cheong, et al. 2009, Seo et al. 2016 y Lie et al. 2019).

## 7.2 El amonio no estimula la proliferación de células no cancerosas.

Estudios previos (Cheong, et al. 2009, Levine, et al., 2007, Yonekawa, et al. 2013 y Lie et al. 2019). han reportado que en células de mama MCF10A, la suplementación con amonio 4mM resulta tóxica e induce apoptosis. Por otra parte, y caso particular, Lie et al. 2019 reportó que la línea celular de fibroblastos embrionarios de riñón humano HEK293 expuestas a 0.8 mM NH<sub>4</sub>Cl en ausencia de glutamina, son capaces de proliferar. A pesar de ello no se atribuye a la

utilización de amonio como fuente de nitrógeno vía GDH, ya que no activa la vía de señalización mTORC1 como en el caso anteriormente discutido en el cáncer de mama no metastásico MCF7; sino que se reporta que es capaz de proliferar por la inducción de autofagia en presencia de amonio. El caso particular de HEK293 concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde el amonio no resulta tóxico cultivadas en presencia de glutamina y son capaces de proliferar en concentraciones de hasta 0.5 mM. Sin embargo, no se estimuló la proliferación en comparación con el control sin amonio y concentraciones mayores a 1 mM incrementaron el tiempo de duplicación y decreció la densidad celular. En el caso de las otras líneas celulares no tumorales 3T3 y BJ, que no habían sido evaluadas anteriormente, al exponerse a  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no se estimuló la proliferación y aumentaron los tiempos de duplicación en todas las condiciones evaluadas (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mM), siendo la máxima concentración de 10 mM la más agresiva casi deteniendo la duplicación celular en la línea celular. Por lo anterior el amonio resulta tóxico en líneas celulares no cancerosas y no estimula la proliferación. 7.3 La exposición a amonio aumenta el contenido de la GDH.

### 7.3 La exposición a amonio no incrementa el contenido de la GDH.

La expresión del contenido de proteína total de GDH no presenta diferencias contrastantes en las líneas celulares evaluadas de cáncer de próstata y colon en exposición a 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 5 días, concordando con la literatura donde tampoco se encuentran diferencias en el contenido de proteína total de GDH en líneas celulares de cáncer (MCF7, T47D, SH-SY5Y, HCT116, HT29, A549, PC3 y HCT116) expuestas a este metabolito (Takeuchi et al., 2018, Lie et al. 2019). Por otra parte, en estos reportes al analizar la expresión de las diferentes isoformas (GDH1/GDH2) se observa una diferencia en el perfil de expresión de estas y las diferentes líneas celulares (Takeuchi et al., 2018 y Lie et al. 2019), siendo la GDH1 la isoforma predominante en líneas celulares de cáncer y no cancerosas (PC3, HCT116, MCF10A, HEK293) (Takeuchi et al. 2018 y Lie et al. 2019). Sin embargo, en MCF7 y T47D, aunque también presentan ambas isoformas, se observa un mayor contenido de hasta 2 veces de GDH2 con respecto a HCT116 y PC3 (Takeuchi et al. 2018, Lie et al. 2019). Se ha denominado a la GDH2 como la isoforma responsable de la utilización del amonio como fuente de nitrógeno, ya que al sobreexpresar el mRNA de *GLUD2* en PC3 se logró que esta línea celular proliferara en condiciones sin glutamina más amonio (Takeuchi et al. 2018).

#### 7.4 Incremento de la actividad de la GDH en presencia de amonio.

En este proyecto observamos que las actividades de los extractos celulares, incubados previamente en presencia de 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 4 días, tienen una tendencia a incrementar de 0.2- 2 veces en comparación con el control sin exposición a amonio. Se ha reportado una actividad  $V_{\text{maxrev}}$  de la GDH en extractos totales de hígado de rata de 0.51 nmol/min\*mg prot. (Botman et al., 2014), considerablemente menor que los obtenidos en estas líneas celulares de cáncer, en hepatoma de roedor; se ha determinado una  $V_{\text{maxrev}}$  de  $159\pm 19$  nmol/min\*mg prot. (Moreno-Sánchez et al., 2020). Sin embargo, estas son fracciones mitocondriales enriquecidas por lo que la actividad aumenta. Por otra parte, en extractos celulares de MCF7 Y HeLa se reportó un decremento en la actividad reversa de la GDH (35–70 mU/mg\* proteína) de células previamente incubadas en 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , a lo cual se atribuye el decremento de la actividad a la turbidez de los extractos (Moreno-Sánchez et al. 2020). A este respecto se han reportado modificaciones post-traduccionales de fosforilación en la GDH al ser incubadas con 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Moreno-Sánchez et al. 2020) por lo que la activación y aumento en la actividad de la GDH en células tumorales de PC3, HCT116 y Colo205 podría correlacionar con este mecanismo de regulación en presencia de concentraciones suprafisiológicas de amonio y su efecto en proliferación.

En HCT116 Y PC3 se ha reportado que no son capaces de utilizar el amonio como fuente de nitrógeno para proliferar en condiciones sin glutamina por tener un menor nivel de expresión de la GDH2. No obstante, estos estudios desestimaron la afinidad por amonio de la GDH1, la cual presenta una  $K_{0.5}$  de 15-60 mM. Podría no tener una relevancia aparente su rol anabólico en condiciones fisiológicas. Pero, al ajustarse la función cinética de la GDH a la ecuación de Monod Wyman Changueux se observa una  $K_{0.5}$  por amonio de 6 -12 mM, siendo viable la capacidad de la GDH1 de catalizar esta reacción hacia la incorporación de amonio como fuente de nitrógeno en condiciones fisiológicas y patológicas (Moreno-Sánchez et al. 2020); en presencia de glutamina y recordando que la concentración intracelular de  $\text{NH}_4^+$  en tumores es de 1-5 mM e incluso en pacientes en etapas terminales de cáncer se ha reportado un promedio de  $6 \pm 2$  mM de amonio en sangre, incluso hasta una máxima concentración de 10 mM (Kodama et al. 2015). Recordando que PC3 y HCT116 en presencia de glutamina el amonio estimuló la proliferación hasta una concentración de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sin resultar tóxico.

La demostración de la actividad de la GDH se ha realizado mediante un enfoque metabolómico mediante experimentos de marcaje y rastreo suplementando amonio radioactivo (Spinelli et al.

2017, Takeuchi 2018, Lie et al.2019) observando la síntesis de aminoácidos después de 24-72 horas en ausencia de glutamina. Por otra parte, se abordó mediante un enfoque ómico; al realizar el *knockdown* o sobreexpresión del mRNA de las dos isoformas de la GDH GLUD1 y GLUD2 y observar la capacidad o incapacidad de proliferar en ausencia de glutamina más amonio. En este sentido, el efecto del amonio en la proliferación y el efecto neto de la GDH reportado; podría verse enmascarado al encontrarse en fase estacionaria y la posibilidad de acción de otras enzimas del metabolismo del amonio como la GSL, además de otros mecanismos de regulación por el estrés de la depleción de la glutamina como la inducción de autofagia por la presencia de amonio en algunas líneas celulares (Cheong, et al. 2009, Levine, et al., 2007, Yonekawa, et al. 2013, Tardito et al. 2015 y Lie et al. 2019).

La determinación del rol anabólico de la GDH solo mediante el enfoque ómico y metabolómico presenta ciertas limitaciones, ya que el análisis se basa en monitorear los cambios en el contenido de ARNm y proteínas partiendo del dogma central de la biología molecular suponiendo un flujo unidireccional de información desde los genes, al ARNm y a las proteínas, sin tomar en cuenta modificaciones postraduccionales que pueden alterar la función / actividad de la enzima y los mecanismos reguladores entran en acción, para coordinar las actividades de las proteínas de las vías / procesos celulares, con el fin de mantener la homeostasis celular. (Moreno-Sánchez, et al. 2015) como es el caso del análisis metabolómico que no toma en cuenta la participación de otras enzimas involucradas como la GS y la CPS1 en el metabolismo del amonio donde también es incorporado y podrían colaborar a la asimilación y síntesis de aminoácidos.

Por tanto, aunado a que la reacción de la GDH se ve favorecida en su reacción reversa resulta importante realizar el análisis de la cinética, enzimática para determinar la actividad real de la enzima y sus mecanismos reguladores que dictan en última instancia los resultados finales de una vía / proceso celular (Moreno-Sánchez, et al. 2015).

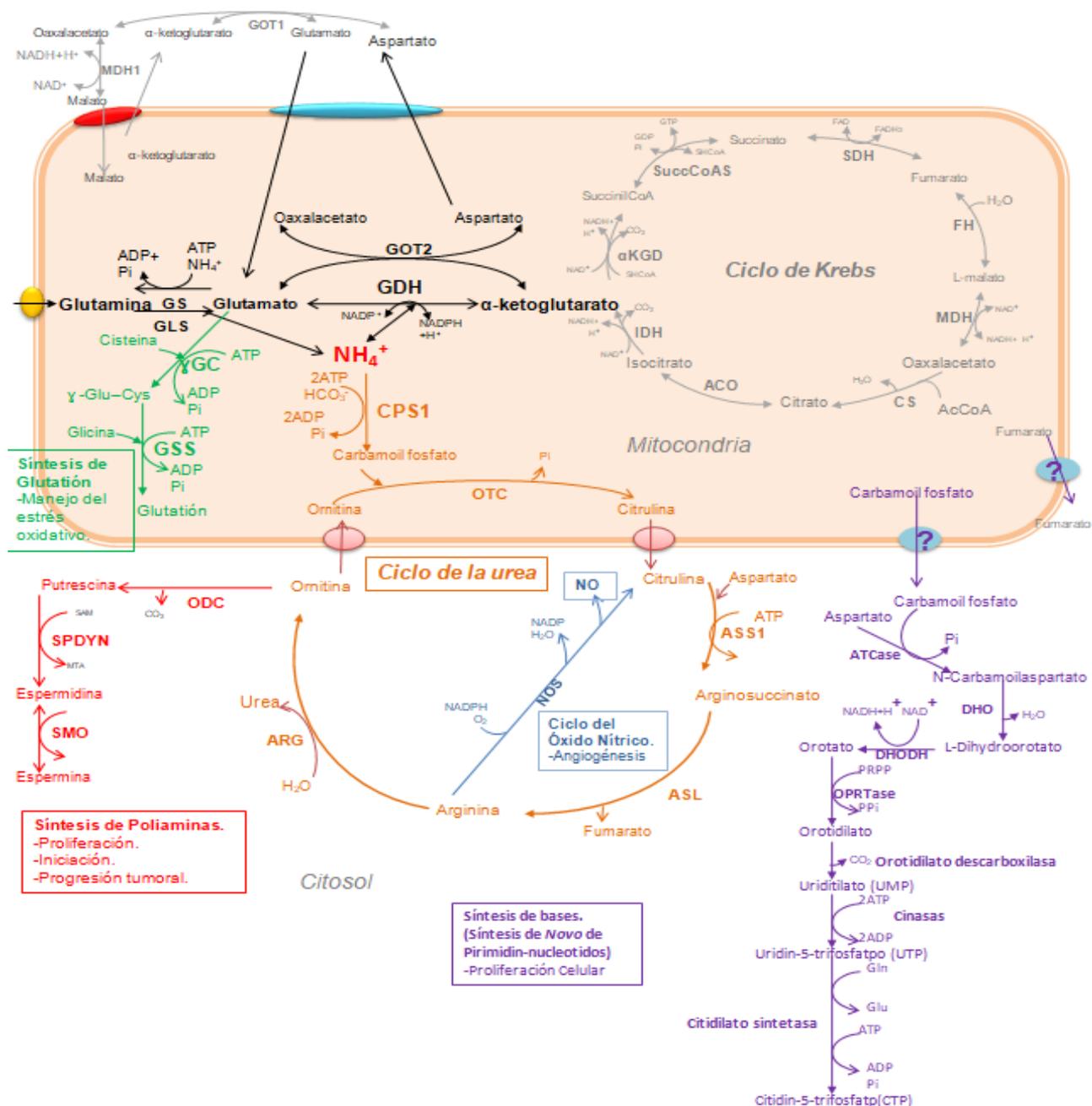
## 8.- Conclusiones.

1. El amonio estimula la proliferación en líneas celulares de cáncer de próstata y colon de humano mediante la activación de la GDH.
2. No se detectaron diferencias en la expresión de la GDH entre células tumorales expuestas a 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , en contraste del grupo celular control libre de suplemento.
3. Las células tumorales expuestas a 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  desarrollan mayor actividad ( $V_{maxrev}$ ) en la reacción reversa de la GDH en comparación con células libres de suplementación.

## 9.- Perspectivas.

Como hemos observado el amonio tiene un efecto en la proliferación celular como fuente de nitrógeno en células tumorales (Spinelli et al. 2017, Takeuchi et al. 2018, Lie et al. 2019, Moreno-Sánchez et al. 2020). La incorporación del amonio y el metabolismo del nitrógeno en el cáncer es un área de interés emergente y poco estudiada, resulta de importancia entender los mecanismos de detoxificación del amonio, como el ciclo de la urea en tejidos no cancerosos y posible influencia en vías anapleróticas, como la síntesis de glutatión, poliamidas, pirimidín nucleótidos y síntesis de óxido nítrico que podrían favorecer influenciar procesos de progresión tumoral (Iniciación, proliferación, manejo del estrés oxidativo y angiogénesis) (Keshet et al., 2018).

Como un acercamiento inicial, determinar la presencia del ciclo de la urea en células cancerosas y determinar su actividad (la regulación de enzimas y metabolitos) y su efecto en la progresión del cáncer será útil para proponer blancos terapéuticos y biomarcadores innovadores para el tratamiento de esta malignidad (Fig. 14 Modificado de Keshet et al. 2018).



**Fig. 14. Asimilación de amonio y metabolismo de nitrógeno.** Vías involucradas en el metabolismo de nitrógeno; 1) generación y asimilación de amonio 2) intermediarios del ciclo de Krebs 3) síntesis de Urea 4) síntesis de glutatión 5) síntesis de poliamidas, 6) síntesis de pirimidín nucleótidos 7) ciclo del óxido nítrico. Varios de estos procesos se han asociado con la progresión tumoral -iniciación, proliferación, angiogénesis, manejo de estrés oxidante- (Modificado de Keshet et al. 2018). Abreviaturas: GS (Glutamina Sintetasa), GLS (Glutaminasa), GOT2 (Aspartato aminotransferasa), GDH (Glutamato Deshidrogenasa), αKGD (α-Ketoglutarato Deshidrogenasa), SuccCoAS (Succinil CoA Sintetasa), SDH (Succinato Deshidrogenasa), FH (Fumarato Hidratasa), CS (Citrato Sintetasa), MDH (Malato Deshidrogenasa), ACO (Aconitasa), IDH (Isocitrato Deshidrogenasa), γGC, γ - glutamilcisteina sintetasa, GSS (Glutatión Sintetasa), CPS1 (Carbamoil Fosfato Sintetasa 1), OTC (Ornitina Transcarbamilasa), ASS1 (Argininosuccinato Sintetasa 1), ASL (Argininosuccinato Liasa), ARG (Arginasa), ODC (Ornitina Descarboxilasa), SPDYN (Espermidina Sintasa), SMO (Espermina Oxidasa), ATCase (Aspartate Transcarbomilasa), DHO (Dihidroorotasa), DHODH (Dihidroorotato Deshidrogenasa), OPRTase (Orotato Fosforibosiltransferasa).

## Referencias.

- Botman, D., Tigchelaar, W., & Van Noorden, C. J. (2014). Determination of glutamate dehydrogenase activity and its kinetics in mouse tissues using metabolic mapping (quantitative enzyme histochemistry). *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 62(11), 802–812. <https://doi.org/10.1369/0022155414549071>
- Cantor, J. R., Abu-Remaileh, M., Kanarek, N., Freinkman, E., Gao, X., Louissaint, A., Jr, Lewis, C. A., & Sabatini, D. M. (2017). Physiologic Medium Rewires Cellular Metabolism and Reveals Uric Acid as an Endogenous Inhibitor of UMP Synthase. *Cell*, 169(2), 258–272.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.023>
- Cheong, H., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (2012). Autophagy and ammonia. *Autophagy*, 8(1), 122–123. <https://doi.org/10.4161/auto.8.1.18078>
- Choi, B. H., & Coloff, J. L. (2019). The Diverse Functions of Non-Essential Amino Acids in Cancer. *Cancers*, 11(5), 675. <https://doi.org/10.3390/cancers11050675>
- Cluntun, A. A., Lukey, M. J., Cerione, R. A., & Locasale, J. W. (2017). Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends in cancer*, 3(3), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.01.005>
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-1081. doi:10.1093/carcin/bgp127
- Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., & Newsholme, P. (2018). Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*, 10(11), 1564. <https://doi.org/10.3390/nu10111564>
- Curi, R., Lagranha, C. J., Doi, S. Q., Sellitti, D. F., Procopio, J., Pithon-Curi, T. C., Corless, M., & Newsholme, P. (2005). Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of cellular physiology*, 204(2), 392–401. <https://doi.org/10.1002/jcp.20339>
- DeBerardinis, R. J., & Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29(3), 313–324. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.358>
- DeBerardinis, R. y Chandel, N. (2016) Fundamentals of Cancer Metabolism. *Science Advances*. 2 : e1600200
- Di Prisco, G., Banay-Schwartz, M., & Strecker, H. J. (1968). Glutamate dehydrogenase in nuclear and mitochondrial fractions of rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 33(4), 606–612. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(68\)90339-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(68)90339-2)
- Ehrig, K., Kilinc, M. O., Chen, N. G., Stritzker, J., Buckel, L., Zhang, Q., & Szalay, A. A. (2013). Growth inhibition of different human colorectal cancer xenografts after a single intravenous injection of oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *Journal of translational medicine*, 11, 79. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-79>

- Fan, J., Kamphorst, J. J., Mathew, R., Chung, M. K., White, E., Shlomi, T., & Rabinowitz, J. D. (2013). Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Molecular systems biology*, 9, 712. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.65>
- Gameiro, P. A., Yang, J., Metelo, A. M., Pérez-Carro, R., Baker, R., Wang, Z., Arreola, A., Rathmell, W. K., Olumi, A., López-Larrubia, P., Stephanopoulos, G., & Iliopoulos, O. (2013). In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell metabolism*, 17(3), 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.002>
- The Global Cancer Observatory [GLOBOCAN] (2018) Mexico Fact Sheets.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hein, A. L., Brandquist, N. D., Ouellette, C. Y., Seshacharyulu, P., Enke, C. A., Ouellette, M. M., Batra, S. K., & Yan, Y. (2019). PR55 $\alpha$  regulatory subunit of PP2A inhibits the MOB1/LATS cascade and activates YAP in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, 8(11), 63. <https://doi.org/10.1038/s41389-019-0172-9>
- Hensley, C. T., Wasti, A. T., & DeBerardinis, R. J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of clinical investigation*, 123(9), 3678–3684. <https://doi.org/10.1172/JCI69600>
- Hsieh, A. L., Walton, Z. E., Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2015). MYC and metabolism on the path to cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 43, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.003>
- Huang, D., Li, C., & Zhang, H. (2014). Hypoxia and cancer cell metabolism. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 46(3), 214–219. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt148> *Cancer & metabolism*, 4, 5. <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0145-9>
- Jin, L., Alesi, G. N., & Kang, S. (2016). Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 35(28), 3619–3625. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.447>
- Keshet, R., Szlosarek, P., Carracedo, A., & Erez, A. (2018). Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism. *Nature reviews. Cancer*, 18(10), 634–645. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0054-z>
- Kodama, Yoshiyuki & Konishi, Tetsuo & Nagaoka, Yasuhiro & Kitai, Hiroya & Aoki, Keisuke. (2015). Study on blood ammonia in terminally ill cancer patients. *Palliative Care Research*. 10. 168-173. 10.2512/jspm.10.168.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, 176(1-2), 11–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
- Lieu, E. L., Nguyen, T., Rhyne, S., & Kim, J. (2020). Amino acids in cancer. *Experimental & molecular medicine*, 52(1), 15–30. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0375-3>

- Luo, J., Solimini, N. L., & Elledge, S. J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136(5), 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.024>
- Martinelle, K., & Häggström, L. (1993). Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes. *Journal of biotechnology*, 30(3), 339–350. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90148-g](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90148-g)
- Mastorodemos, V., Kotzamani, D., Zaganas, I., Arianoglou, G., Latsoudis, H., & Plaitakis, A. (2009). Human GLUD1 and GLUD2 glutamate dehydrogenase localize to mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochemistry and cell biology*, 87(3), 505–516. <https://doi.org/10.1139/o09-008>
- McGivan, J. D., & Chappell, J. B. (1975). On the metabolic function of glutamate dehydrogenase in rat liver. *FEBS letters*, 52(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80624-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80624-7)
- Moreno-Sánchez, R., Gallardo-Pérez, J. C., Rodríguez-Enríquez, S., Saavedra, E., & Marín-Hernández, Á. (2017). Control of the NADPH supply for oxidative stress handling in cancer cells. *Free radical biology & medicine*, 112, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.018>
- Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjanek FD, Rodríguez-Enríquez S. Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. *FEBS J*. 2016;283(1):54-73. doi:10.1111/febs.13535
- Moreno-Sánchez, R., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J. C., Pacheco-Velázquez, S. C., Robledo-Cadena, D. X., Padilla-Flores, J. A., Saavedra, E., & Rodríguez-Enríquez, S. (2020). Physiological Role of Glutamate Dehydrogenase in Cancer Cells. *Frontiers in oncology*, 10, 429.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(3), 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Otto A. M. (2016). Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism.
- Pacheco-Velázquez, S. C., Robledo-Cadena, D. X., Hernández-Reséndiz, I., Gallardo-Pérez, J. C., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Enríquez, S. (2018). Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype. *Molecular pharmaceuticals*, 15(6), 2151–2164. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00015>
- Panda, P., Suar, M., Singh, D., Pandey, S. M., Chaturvedi, M. M., & Purohit, J. S. (2011). Characterization of nuclear glutamate dehydrogenase of chicken liver and brain. *Protein and peptide letters*, 18(12), 1194–1203. <https://doi.org/10.2174/092986611797642698>
- Pascual, G., Domínguez, D., & Benitah, S. A. (2018). The contributions of cancer cell metabolism to metastasis. *Disease models & mechanisms*, 11(8), dmm032920. <https://doi.org/10.1242/dmm.032920>
- Plaitakis, A., Kalef-Ezra, E., Kotzamani, D., Zaganas, I., & Spanaki, C. (2017). The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology*, 6(1), 11. <https://doi.org/10.3390/biology6010011>

- Podar, K., & Anderson, K. C. (2010). A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(9), 1722–1728. <https://doi.org/10.4161/cc.9.9.11358>
- Reid, M. A., Wang, W. I., Rosales, K. R., Welliver, M. X., Pan, M., & Kong, M. (2013). The B55 $\alpha$  subunit of PP2A drives a p53-dependent metabolic adaptation to glutamine deprivation. *Molecular cell*, 50(2), 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.008>
- Rodríguez-Enríquez, S., Carreño-Fuentes, L., Gallardo-Pérez, J. C., Saavedra, E., Quezada, H., Vega, A., Marín-Hernández, A., Olín-Sandoval, V., Torres-Márquez, M. E., & Moreno-Sánchez, R. (2010). Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(10), 1744–1751. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.07.010>
- Rodríguez-Enríquez, S., Gallardo-Pérez, J. C., Avilés-Salas, A., Marín-Hernández, A., Carreño-Fuentes, L., Maldonado-Lagunas, V., & Moreno-Sánchez, R. (2008). Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *Journal of cellular physiology*, 216(1), 189–197. <https://doi.org/10.1002/jcp.21392>
- Rodríguez-Enríquez, S., Hernández-Esquivel, L., Marín-Hernández, A., El Hafidi, M., Gallardo-Pérez, J. C., Hernández-Reséndiz, I., Rodríguez-Zavala, J. S., Pacheco-Velázquez, S. C., & Moreno-Sánchez, R. (2015). Mitochondrial free fatty acid  $\beta$ -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 65, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.06.010>
- Rodríguez-Enríquez, S., Torres-Márquez, M. E., & Moreno-Sánchez, R. (2000). Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 375(1), 21–30. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1582>
- Scriver, C. R., & Rosenberg, L. E. (1973). Amino acid metabolism and its disorders. *Major problems in clinical pediatrics*, 10, 1–478.
- Seo, J. W., Choi, J., Lee, S. Y., Sung, S., Yoo, H. J., Kang, M. J., Cheong, H., & Son, J. (2016). Autophagy is required for PDAC glutamine metabolism. *Scientific reports*, 6, 37594. <https://doi.org/10.1038/srep37594>
- Shen, C., Gu, M., Song, C., Miao, L., Hu, L., Liang, D., & Zheng, C. (2008). The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured in vitro. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 36(4), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2008.02.002>
- Smedberg, M., & Wernerman, J. (2016). Is the glutamine story over?. *Critical care (London, England)*, 20(1), 361. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1531-y>
- Spanaki, C., Kotzamani, D., Kleopa, K., & Plaitakis, A. (2016). Evolution of GLUD2 Glutamate Dehydrogenase Allows Expression in Human Cortical Neurons. *Molecular neurobiology*, 53(8), 5140–5148. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9429-2>

- Spinelli, J. B., Yoon, H., Ringel, A. E., Jeanfavre, S., Clish, C. B., & Haigis, M. C. (2017). Metabolic recycling of ammonia via glutamate dehydrogenase supports breast cancer biomass. *Science (New York, N. Y.)*, 358(6365), 941–946. <https://doi.org/10.1126/science.aam9305>
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>
- Tajan M, Hock AK, Blagih J, et al. A Role for p53 in the Adaptation to Glutamine Starvation through the Expression of SLC1A3. *Cell Metabolism*. 2018;28(5):721-736.e6. doi:10.1016/j.cmet.2018.07.005
- Tajan, M., Hock, A. K., Blagih, J., Robertson, N. A., Labuschagne, C. F., Kruiswijk, F., Humpton, T. J., Adams, P. D., & Vousden, K. H. (2018). A Role for p53 in the Adaptation to Glutamine Starvation through the Expression of SLC1A3. *Cell metabolism*, 28(5), 721–736.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.005>
- Tanner, L., Goglia, A., Wei, M., Sehgal, T., Parsons, L., Park, J., White, E., Toettcher, J., & Rabinowitz, J. (2018). Four Key Steps Control Glycolytic Flux in Mammalian Cells. *Cell Systems*, 7(1), 49–62.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.06.003>
- Vander Heiden, M. G., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168(4), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>
- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N. Y.)*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology*, 8(6), 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>
- Wu, S., Yin, X., Fang, X., Zheng, J., Li, L., Liu, X., & Chu, L. (2015). c-MYC responds to glucose deprivation in a cell-type-dependent manner. *Cell death discovery*, 1, 15057. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.57>
- Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual review of biomedical engineering*, 19, 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
- Yonekawa, T., & Thorburn, A. (2013). Autophagy and cell death. *Essays in biochemistry*, 55, 105–117. <https://doi.org/10.1042/bse0550105>
- Zong, W. X., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. *Molecular cell*, 61(5), 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>
- Zu, X. L., & Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(3), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.136>



## Physiological Role of Glutamate Dehydrogenase in Cancer Cells

Rafael Moreno-Sánchez\*, Álvaro Marín-Hernández\*, Juan C. Gallardo-Pérez, Silvia C. Pacheco-Velázquez, Diana X. Robledo-Cadena, Joaquín Alberto Padilla-Flores, Emma Saavedra and Sara Rodríguez-Enriquez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ciudad de México, Mexico

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Antonio Giuseppe Naccarato,  
University of Pisa, Italy

#### Reviewed by:

Andrea Mozzarelli,  
University of Parma, Italy  
Yuanping Xiong,  
The First Affiliated Hospital of  
Nanchang University, China

#### \*Correspondence:

Rafael Moreno-Sánchez  
rafael.moreno@cardiologia.org.mx  
Álvaro Marín-Hernández  
marinhernandez@yahoo.com.mx

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Metabolism,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

Received: 13 January 2020

Accepted: 10 March 2020

Published: 09 April 2020

#### Citation:

Moreno-Sánchez R,  
Marín-Hernández Á,  
Gallardo-Pérez JC,  
Pacheco-Velázquez SC,  
Robledo-Cadena DX,  
Padilla-Flores JA, Saavedra E and  
Rodríguez-Enriquez S (2020)  
Physiological Role of Glutamate  
Dehydrogenase in Cancer Cells.  
Front. Oncol. 10:429.  
doi: 10.3389/fonc.2020.00429

$\text{NH}_4^+$  increased growth rates and final densities of several human metastatic cancer cells. To assess whether glutamate dehydrogenase (GDH) in cancer cells may catalyze the reverse reaction of  $\text{NH}_4^+$  fixation, its covalent regulation and kinetic parameters were determined under near-physiological conditions. Increased total protein and phosphorylation were attained in  $\text{NH}_4^+$ -supplemented metastatic cells, but total cell GDH activity was unchanged. Higher  $V_{\text{max}}$  values for the GDH reverse reaction vs. forward reaction in both isolated hepatoma (HepM) and liver mitochondria [rat liver mitochondria (RLM)] favored an  $\text{NH}_4^+$ -fixing role. GDH sigmoidal kinetics with  $\text{NH}_4^+$ , ADP, and leucine fitted to Hill equation showed  $n_H$  values of 2 to 3. However, the  $K_{0.5}$  values for  $\text{NH}_4^+$  were over 20 mM, questioning the physiological relevance of the GDH reverse reaction, because intracellular  $\text{NH}_4^+$  in tumors is 1 to 5 mM. In contrast, data fitting to the Monod-Wyman-Changeux (MWC) model revealed lower  $K_m$  values for  $\text{NH}_4^+$ , of 6 to 12 mM. *In silico* analysis made with MWC equation, and using physiological concentrations of substrates and modulators, predicted GDH N-fixing activity in cancer cells. Therefore, together with its thermodynamic feasibility, GDH may reach rates for its reverse,  $\text{NH}_4^+$ -fixing reaction that are compatible with an anabolic role for supporting growth of cancer cells.

**Keywords:** ammonium, metastatic cancer cells, GDH kinetics, cooperativity, monod-wyman-changeux model

## INTRODUCTION

It has been proposed that the primary metabolic function of glutamate dehydrogenase [GDH;  $\text{Glu} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 2\text{-OG} + \text{NH}_3$  (or  $\text{NH}_4^+$ ) +  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ ; EC: 1.4.1.3] is to produce ammonia, or the toxic ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), either for urea synthesis in liver, or for direct clearance in kidney (1–5), or to produce 2-oxoglutarate (2-OG) for export to neurons from astrocytes (6). In the forward, oxidative deaminating reaction, GDH provides reducing equivalents as NADPH for oxidative stress management in the mitochondrial matrix and 2-OG for Krebs cycle and oxidative phosphorylation. This canonical role of GDH is a consequence of the efficient transference by transaminases of the  $\alpha$ -amino group of several amino acids to 2-OG forming glutamate (Glu). However, it has been shown that the predominant source of ammonium in liver derives from glutamine, not from glutamate (6), and the GDH reaction seems positioned near its thermodynamic equilibrium (3). Moreover, significant GDH activity is also present in mitochondria of nonureogenic organs, such as heart, skeletal muscle, and brain, and the gene encoding GDH1 in humans is expressed in all tissues, whereas the GDH2 gene expression is specific for nerve tissues and testis (4, 5), although the kinetic properties of both GDH isoenzymes are