



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Uso del oxamato como herramienta para
revelar los sitios de control en la glucólisis
de células tumorales humanas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICO
BIOLÓGICA**

P R E S E N T A :

ITZEL ESTEFANIA TREJO CRUZ



Tutor: Dr. Álvaro Marín Hernández
Asesora: QFB Patricia Vidal Millán
Asesor: QFB Gildardo Herrera Quiroz

CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO

MARZO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron e hicieron posible que este trabajo se realizara con éxito.

A mi tutor por el tiempo dedicado y los conocimientos compartidos, además de permitirme formar parte de su equipo de trabajo y exigirme cada vez, además de la confianza brindada.

A Luz por siempre ayudarme y enseñarme cosas nuevas.

A todas las personas que forman parte el Departamento de Bioquímica.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Al CONACYT por el apoyo al proyecto con número A-1-S-40481, que permitió el desarrollo de esta tesis, así como tener una beca durante el desarrollo de la misma.

DEDICATORIAS

A mis padres por la vida y por enseñarme como vivirla, por el apoyo y el amor que siempre me han brindado.

A mi hermana, por enseñarme a ser su hermana mayor y su amiga.

A mis abuelos, por cuidarme siempre e inculcarme la honradez y humildad.

A mis familiares y amigos, por acompañarme en este proceso.

Y al final pero no menos importante, a todos mis profesores que me ayudaron a que hoy pueda crecer como profesional y como persona.

ÍNDICE

RESUMEN	5
El cáncer	8
La glucólisis	10
La glucólisis tumoral	14
El oxamato y la glucólisis.....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPOTESIS	20
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Diseño de estudio.....	21
Instrumentos	21
Cultivos celulares	22
Medición del flujo glucolítico y concentración de metabolitos	23
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
CONCLUSIONES	42
PERSPECTIVAS.....	43
REFERENCIAS.....	44

RESUMEN

La inhibición de la glucólisis se ha propuesto como una opción terapéutica contra el cáncer, debido a que la glucólisis contribuye con esqueletos carbonados para una activa proliferación. Para inhibir la glucólisis es necesario disminuir la actividad de los sitios de control de esta vía. En células tumorales se ha reportado que los sitios de control son la HPI, la HK y el GLUT. Interesantemente, al usar oxamato como inhibidor de la glucólisis se observó la acumulación de Fru1,6BP provocando la inhibición de la HPI preferentemente en las células tumorales de rata AS-30D sin modificar la glucólisis de células normales de rata (hepatocitos).

Por lo tanto, se decidió hacer uso del oxamato como herramienta para poder determinar si la HPI es un sitio de control en las células humanas de diversos tipos de cáncer. Con el uso del oxamato (10mM) se observó que el flujo glucolítico disminuyó entre 56 a 85% que correlacionó con un aumento de la Fru1,6BP y DHAP en las células HeLa (cáncer cervical), U-373 MG (Glioblastoma de cerebro), MDA-MB 468 (cáncer de mama) y en las células no tumorales MCF10A (tejido epitelial de mama). Sin embargo, en las líneas tumorales humanas A-549 (cáncer de pulmón) la glucólisis no se modificó, aunque aumento de la Fru1,6BP. Mientras que en las células SiHa (cáncer de cérvix) aunque se inhibió la glucólisis no estuvo asociado a una acumulación de Fru1,6BP.

Con el fin de ampliar un poco más esta investigación, se probó un inhibidor de la GAPDH, al ácido Koningico, en células tumorales de rata (AS-30D) y humanas (HeLa). Este inhibidor inhibió el flujo glucolítico asociado con un aumento de la Fru1,6BP.

Con base a los resultados obtenidos concluimos que en las células humanas HeLa, U373 MG, MDA-MB-468 y MCF-10A la HPI es un sitio de control de la glucólisis. Mientras que la HPI podría no ser un sitio de control en las células tumorales A-549 y SiHa. Así mismo sugerimos que el KA inhibe la glucólisis de manera similar que el oxamato.

ABREVIATURAS

ALD: Aldolasa

ATP. Adenosín Trifosfato

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato

ENO: Enolasa

F6P: Fructosa-6-fosfato

F2,6BP: Fructosa-2,6-bifosfato

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

G3P: Gliceraldehido-3-fosfato

G6P: Glucosa-6- fosfato

GLUT: Glucosa transportador

HK: Hexocinasa

HPI: Hexosa fosfato isomerasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina

PGK: Fosfoglicerato cinasa

PGAM: 3-fosfoglicerato mutasa

PYR: Piruvato

PFK-1: Fosfofructocinasa tipo 1

PYK: Piruvato cinasa

TPI: Triosa fosfato isomerasa

INTRODUCCIÓN

La glucólisis es una vía metabólica de gran importancia que genera precursores para la síntesis de macromoléculas para la activa proliferación de las células tumorales, así mismo es la principal fuente de ATP cuando las células se encuentran sometidas a hipoxia.

Por lo anterior, la inhibición de la glucólisis ha sido considerada como una opción terapéutica contra el cáncer. Sin embargo, para lograr la inhibición específica de esta vía metabólica es necesario conocer los sitios de control, es decir, las enzimas que al aumentar o disminuir ligeramente su actividad afecta significativamente el flujo de una vía metabólica a diferencia de las enzimas que no controlan, que deben disminuir o incrementar drásticamente su actividad para modificar el flujo de la vía. De tal forma que en estudios previos de nuestro grupo se logró identificar al transportador de glucosa (GLUT), a la hexocinasa (HK) y a la hexosa fosfato isomerasa (HPI) como los principales sitios de control en la glucólisis de las células tumorales de rata AS-30D. De estos sitios se consideró como un potencial blanco terapéutico a la HPI porque tanto el GLUT y la HK son también sitios de control de la glucólisis en las células normales.

Interesantemente, el oxamato inhibió preferentemente la glucólisis en las células tumorales de rata AS-30D y no en células no tumorales como los hepatocitos. Debido a que el oxamato induce la acumulación de fructosa-1,6-bisfosfato (Fru1,6BP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que son inhibidores de la HPI. Por lo tanto, estos resultados indicaron que la HPI es un sitio de control específico para las células tumorales de rata AS-30D.

Considerando lo anterior, en esta tesis se empleará al oxamato como una herramienta experimental para establecer si la HPI puede ser un sitio de control en la glucólisis de las células humanas de diversos tipos de cáncer. Esto lo podremos evaluar al determinar el efecto del oxamato en la velocidad de glucólisis y en la concentración de la Fru1,6BP y DHAP. Los resultados que se obtengan nos

permitirán establecer si la HPI es un sitio de control en las células tumorales humanas.

MARCO TEÓRICO

El cáncer

La Organización Mundial de la Salud define al cáncer como un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. El cáncer es la proliferación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites habituales, y que pueden invadir otros órganos, proceso conocido como metástasis (WHO, 2018).

En México, la incidencia de cáncer en la población va en aumento, los cánceres de mama, de próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón son los más comunes en la población (Tabla 1) (SMEO, 2016). De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía, existe evidencia que en el período de 2011 a 2016, aproximadamente del 27 al 50% de las muertes observadas por tumores malignos en la población menor de 25 años se deben a cáncer de órganos hematopoyéticos. También, durante el mismo período de tiempo, los cinco principales tipos de cáncer que sobresalen como causa de mortalidad en la población de 30 a 59 años son: los tumores malignos de los órganos digestivos, el cáncer de órganos genitales femeninos, el tumor maligno de mama, el de órganos hematopoyéticos y los tumores malignos de los órganos respiratorios e intratorácicos (INEGI, 2018).

Tabla 1. Cánceres más comunes en hombres y mujeres mexicanas

Hombres	Mujeres
1. Próstata	1. Mamario
2. Colorrectal	2. Tiroides
3. Testicular	3. Cervicouterino
4. Pulmonar	4. Cuerpo uterino

5. Gástrico	5. Colorrectal
-------------	----------------

Existen diversos tratamientos contra el cáncer que se emplean en base al estadio de la enfermedad, es decir, en algunos casos el o los tratamientos tiene como objetivo la cura, mientras que, en otros casos el objetivo es detener el avance de la enfermedad (INFOCANCER, 2019).

Los tipos de tratamiento más utilizados en diferentes estadios del cáncer son:

- Cirugía: Operación donde se extirpa el tejido con células cancerosas.
- Quimioterapia: Se refiere a la administración de medicamentos que son capaces de disminuir la cantidad de células cancerosas al generar la muerte de estas.
- Radioterapia: En este tratamiento se usa una alta dosis de rayos de alta energía (similares a los rayos X) para destruir las células cancerosas y disminuir el tamaño de los tumores.
- Terapia hormonal: También es conocida como terapia endocrina, y se usa como tratamiento para aumentar o interferir con la actividad de hormonas que pueden llegar a influir en el crecimiento de las células tumorales o tumores.
- Inmunoterapia: Este tipo de terapia promueve la activación del sistema inmune del paciente para combatir a las células tumorales.

A pesar de que los tratamientos en muchas ocasiones son efectivos, la mayoría de estos tratamientos generan un daño en las células no tumorales causando efectos secundarios importantes. Estos pueden ser distintos en cada paciente, y variar según los distintos medicamentos y tipos de tratamiento (CDC, 2021).

Algunos de los efectos secundarios más graves son:

- Neutropenia: Se refiere a una disminución en el número de neutrófilos,

que conforman la principal defensa del cuerpo contra las infecciones causadas por bacterias. La neutropenia se presenta en mayor proporción en pacientes que recibieron quimioterapia.

- Linfedema: Este efecto secundario se deriva de un tratamiento de radioterapia, en donde se genera un daño en un ganglio o vaso linfático. El líquido linfático no se puede drenar bien, por lo que se acumula bajo la piel y causa inflamación en parte del cuerpo del paciente.
- Trombosis venosa profunda (TVP): Es generada por la formación de un coagulo en una vena. Generalmente son formados en las extremidades inferiores (piernas, muslos o pelvis) y superiores (en menor porcentaje). Los pacientes que se encuentran o recibieron tratamiento de quimioterapia tienen mayor posibilidad de generar TVP.

De acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer, existen alrededor de 25 efectos secundarios inducidos por los tratamientos contra el cáncer. Además de que la Sociedad Americana de Cáncer menciona que algunos tratamientos contra el cáncer, como la quimioterapia y la radioterapia, pueden aumentar el riesgo de que una persona desarrolle diferentes tipos de cáncer más adelante en la vida. (American Cancer Society, 2021)

Por ello la importancia de encontrar nuevos tratamientos donde el daño sea menor en las células no tumorales y que los efectos secundarios sean mínimos, lo que ha abierto el interés en estudios enfocados a la bioquímica de las células tumorales. Es por ello que diversos grupos de investigación han propuesto a la inhibición de la glucólisis en las células tumorales como alternativa para lograr una disminución en su crecimiento (Marín-Hernández et al., 2016).

La glucólisis

El descubrimiento de la glucólisis comenzó con estudios de fermentación en extractos celulares de levadura, realizados por Eduard Buchner en 1897. Aunque para 1930, gracias a los estudios de Otto Warburg, Hans von Euler-Chelpin,

Gustav Embden, Otto Meyerhoff, la vía fue completada (Nelson et al., 2009). La glucólisis es una vía metabólica compuesta por 10 enzimas que se encuentran en el citosol de la célula y 1 transportador que se encuentra en la membrana celular, esta vía se divide en dos fases:

Fase preparatoria: esta fase se compone de los primeros 6 pasos. Esta fase comienza con el transportador de glucosa (GLUT) que ingresa la molécula de glucosa al interior de la célula, además intervienen 2 moléculas de ATP que elevan el contenido de energía libre de los intermediarios y convirtiendo las hexosas a un producto común, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) (Gonzales-Rengifo G et al., 2007). Aquí participan: la hexocinasa (HK), la fosfohexosa isomerasa (HPI), la fosfofructucinasa tipo 1 (PFK-1), aldolasa (ALD) y triosa fosfato isomerasa (TPI) (Fig. 1).

La segunda parte de esta vía se conoce como la fase de beneficio, en donde la energía se conserva en moléculas de ATP (Gonzales-Rengifo G et al., 2007), y el producto final son 2 moléculas de piruvato. Las enzimas que participan en esta etapa son: la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la fosfoglicerato cinasa (PGK), la fosfoglicerato mutasa (PGAM), la enolasa (ENO) y la piruvato cinasa (PYR) (Fig. 1).

En condiciones de aerobiosis, el piruvato se oxida en la mitocondria a CO_2 y H_2O por el ciclo de Krebs. Mientras que, en condiciones anaeróbicas, el piruvato se reduce a L-Lactato, por acción de la lactato-deshidrogenada (LDH), que genera NAD^+ , que es necesario para que la vía se mantenga activa debido a que es sustrato de la GAPDH (Marín-Hernández et al., 2011). Además, la glucólisis es importante para la producción de esqueletos carbonados, que actúan como precursores en diversas vías anabólicas (Fig. 1), por ejemplo:

- Glucosa 6-fosfato (G6P) que es sustrato de la vía de las pentosas fosfato (PPP) para la formación de ribosa 5-fosfato, importante en la síntesis de nucleótidos; a la par se forma NADPH, que es el principal donador de electrones en el sistema antioxidante, además útil en la

síntesis de lípidos y de la desoxirribosa (Marín-Hernández et al., 2011). Además, la G6P también es precursor de la glucogénesis (síntesis de glucógeno) y vía biosintética de hexosamina (UDP-GlcNAc) (Robey, 2006, Pedersen, 2007)

- Dihidroxiacetona fosfato (DHAP) que participa en la síntesis de triglicéridos. Debido a que la DHAP se reduce a L-glicerol-3-fosfato, generando glicerol, que es base para sintetizar triacilgliceroles. Esta reacción es catalizada por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa que utiliza NAD⁺/NADH como cofactor (Calder, 2016).

- 3-fosfoglicerato que participa en el primer paso de la vía de síntesis de la serina; además participa en la síntesis de purinas y pirimidinas. En las plantas, la serina es precursora de algunos aminoácidos como la glicina, cisteína y en bacterias del triptófano. (Nelson et al., 2009)

- Piruvato que es precursor del Acetil CoA siendo base de la síntesis de ácidos grasos y además de ser precursor de aminoácidos (alanina) que son base para la síntesis de proteínas.

Gracias a estudios previos se ha establecido que los sitios de control de la glucólisis en las células no tumorales son: el GLUT, la HK y la PFK-1. Un sitio de control, es la enzima/transportador que al tener un pequeño aumento o disminución en su actividad genera un cambio significativo en el flujo de la vía. Mientras que una enzima/transportador que no controla debe disminuir o incrementar drásticamente su actividad para observar un cambio en el flujo de la vía.

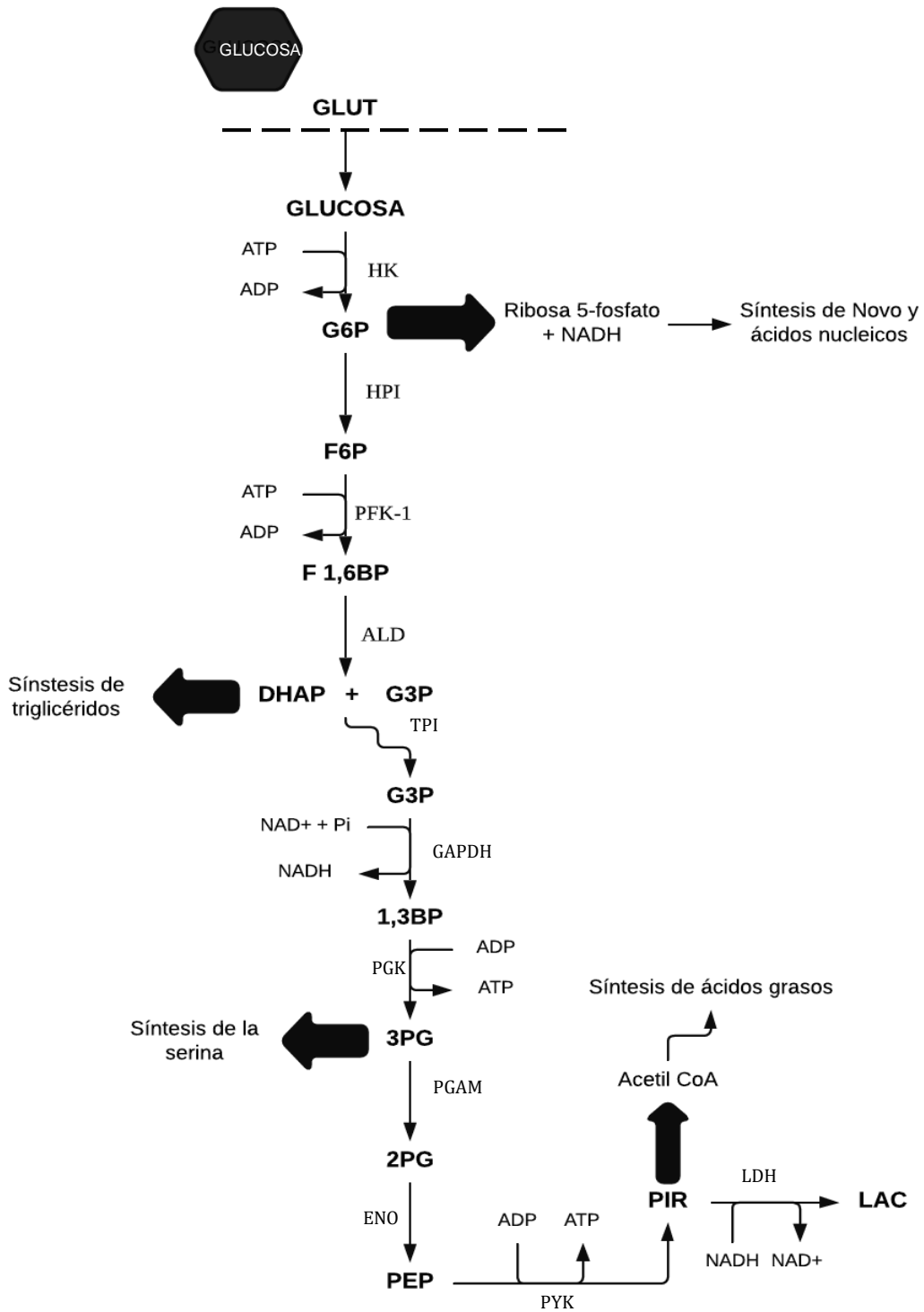


Figura 1 La glucólisis y la interacción con otras vías metabólicas.

La glucólisis tumoral

La producción de lactato es un indicador de la velocidad de la glucólisis y en el caso de las células tumorales esta producción de lactato llega a ser de 5 a 28 veces mayor en comparación con tejidos normales (riñón, hígado, músculo, cerebro y placenta) (Marín-Hernández et al., 2011). Esto correlaciona con un aumento en el consumo de la glucosa en las células tumorales. Este cambio en el metabolismo fue observado por primera vez por Otto Warburg en 1924, y lo nombró glucólisis aerobia y posteriormente se le llamó efecto Warburg (Valle y Soto, 2014).

Como resultado de la sobreproducción de lactato, el microambiente alrededor de las células tumorales se vuelve ácido, con un pH de alrededor de 5.5 (Webb et al., 2011; Justus et al., 2013), por lo que las células normales se ven afectadas. Además, la activa proliferación de las células tumorales deja algunas regiones de los tumores sólidos en hipoxia. Esta condición induce la activación del factor inducido por la hipoxia 1α (HIF- 1α). Este factor incrementa la expresión de las isoformas de las enzimas y transportadores que participan en la glucólisis, promoviendo el aumento en el flujo glucolítico (Marín-Hernández et al., 2009), además porque los sitios que controlan como la PFK-1 presentan cambios en sus mecanismos de regulación.

En experimentos realizados en células tumorales de rata (AS-30D) se observó un incremento en la actividad de la mayoría de las enzimas de la glucólisis de 1 a 4 veces con respecto a las células normales (Marín-Hernández et al. 2011) y la producción de lactato llegó a ser de 5 a 28 veces mayor en tejidos tumorales que en tejidos normales (Pedersen, 1979). Mientras que la actividad de la HK y de la PFK-1 incremento de 306 a 56 veces, respectivamente, en consecuencia, la concentración de los intermediarios glucolíticos (G6P y Fru 1,6 BP) también aumentaron entre 5 y 250 veces (Marín-Hernández et al., 2011). A partir de estos resultados, se propuso que las enzimas HK y PFK-1, no serían los sitios de control en la glucólisis de células tumorales. Posteriormente, nuestro

grupo estableció que los sitios de control en las células tumorales de rata AS-30D son el GLUT, la HK y la HPI.

Características del GLUT

Los transportadores de glucosa son proteínas de membrana, que a través de gradientes electroquímicos transportan moléculas hacia ambos lados de la membrana. Asimismo, trabajan en coordinación con factores hormonales, receptores y segundos mensajeros para poder mantener el flujo de los metabolitos (Machado et al., 2019).

Estos transportadores se clasifican en 2 familias:

- Co-transportadores de sodio/glucosa (SGLT).
- Transportadores de difusión facilitada, (GLUT). Estos transportadores son uniporte, es decir, transportan la glucosa a favor de su gradiente de concentración sin gasto de ATP, y constituyen el principal mecanismo de entrada de la glucosa a la célula (Sandoval-Muñiz et al., 2016). Hasta la fecha se han identificado 14 GLUT; además de agrupan en 3 clases principales de acuerdo a sus características estructurales: La clase I comprende del GLUT1 al 4 y el GLUT14. La clase II lo conforman los GLUT5, 7, 9 y la clase III está conformada por GLUT6, 8, 10 y 12 y el transportador de mioinositol impulsado por protones (HMIT) o GLUT131 (Augustin, 2010).

Características de la HK

La hexocinasa es la primera enzima que participa en la degradación de la glucosa, que ha sido transportada a través de transportadores de glucosa. Una vez dentro del citosol, la glucosa es fosforilada por la HK produciendo G6P. (Roberts y Miyamoto, 2015)

En mamíferos se presentan 4 isoformas de HK:

- HK-I: es la isoforma principal presente en el cerebro, pero también se expresa de forma ubicua.
- HK-II: es la isoforma más abundante en los tejidos sensibles a la insulina, como el músculo adiposo, esquelético y cardíaco.
- HK-III: No es predominante en ningún tejido.
- HK-IV: también conocida como glucocinasa y se encuentra principalmente en hígado y páncreas.

Se ha determinado en estudios que la HK-I, II y III tienen mayor afinidad por la glucosa en comparación con HK-IV. La actividad de los HK es inhibida por G-6P debido a que se produce un mecanismo de inhibición por feedback (John, 2003)

Características de la HPI

La fosfohexosa isomerasa también es conocida como glucosa fosfato isomerasa y fosfoglucosa isomerasa (Arsenieva et al., 2002). Esta enzima es la encargada de catalizar la isomerización de la G6P a F6P. Esta actividad enzimática es importante en la vía de Embden-Meyerhof, en la gluconeogénesis, la ruta de las pentosas fosfato, y la glicosilación de proteínas, lípidos y otras moléculas (Lee y Jeffery, 2005).

Este papel importante que tiene la HPI en el metabolismo de los azúcares fosforilados explica el gran impacto de una deficiencia de PGI en humanos, además que ha sido de interés como diana terapéutica en el metabolismo de los parásitos (Read et al., 2001).

El oxamato y la glucólisis

El oxamato se ha identificado como un análogo del piruvato debido a que inhibe directamente la conversión de piruvato en lactato por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH) (Zeczycki et al., 2010. Ye, 2016) (Fig. 2). Esto se debe a que el oxamato, se puede unir a los sitios de unión para el piruvato y el cofactor NADH (Graham, 2020), y genera que la producción de lactato disminuya, por lo tanto, dirige la oxidación del NADH hacia la cadena respiratoria como sustrato de la NADH oxidasa (Arioli et al., 2013).

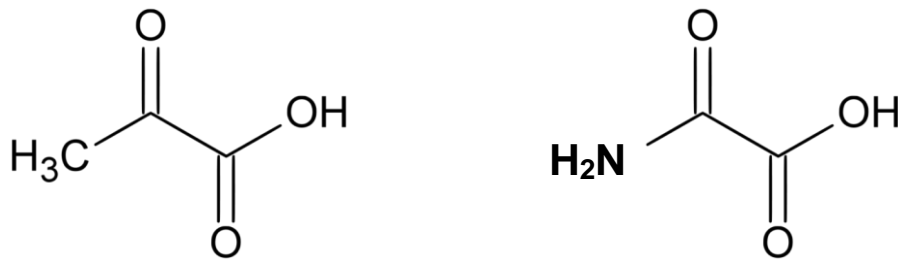


Figura 2. Esqueleto de la molécula de ácido pirúvico y del ácido oxámico

En estudios recientes se ha demostrado que el oxamato genera una disminución en la velocidad del flujo glucolítico en células tumorales de rata AS-30D, debido a que inhibe de varios sitios de la vía glucolítica, como a la lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato cinasa (PYK) y enolasa (ENO), que a pesar de que no son sitios de control, inducen la acumulación de los metabolitos fructosa-1,6-bisfosfato (Fru1,6BP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que son inhibidores de la HK y HPI (Figura 3), sitios que controlan las glucólisis en las células tumorales (Marín-Hernández, 2016). Sin embargo, las constantes de inhibición de la Fru1,6BP ($K_i=0.17$ mM HPI y $K_i=14.9$ mM HK) y la DHAP ($K_i= 9.4$ mM HPI) (Moreno-Sánchez et al., 2017) indican que ambos compuestos afectan preferentemente a la HPI.

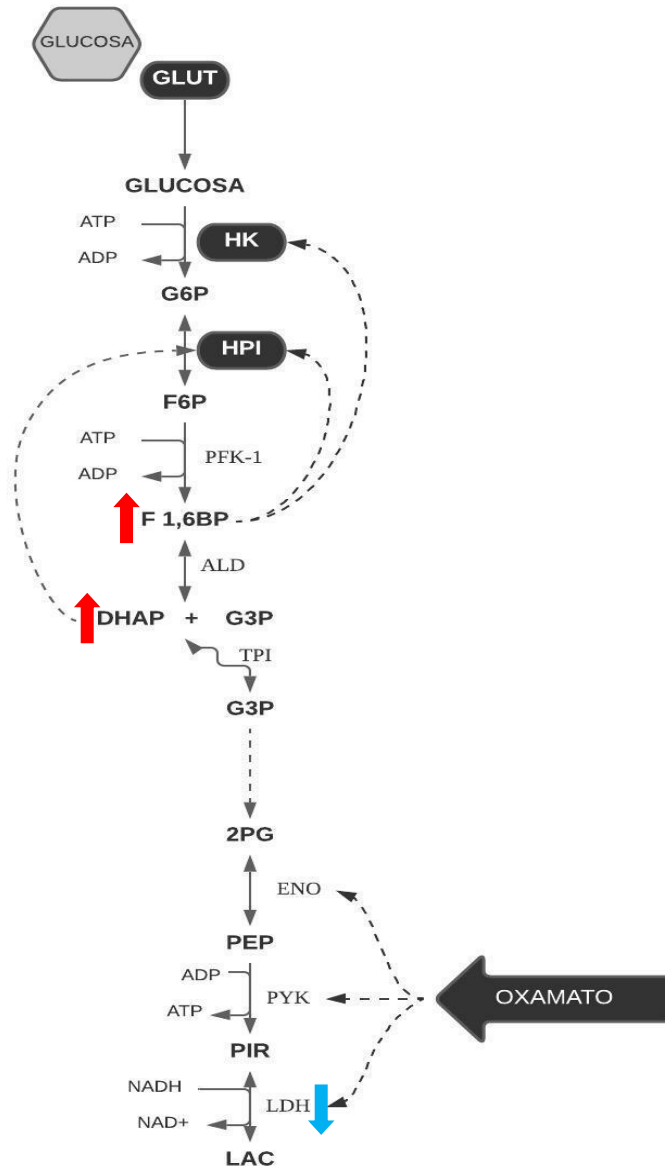


Figura 3. Efecto del oxamato en la glucólisis tumoral.

Debido a que tanto el GLUT y la HK son sitios de control de la glucólisis en las células normales y en las células tumorales de rata. Esto sugirió que el oxamato podría inhibir preferentemente la glucólisis en las células tumorales de rata AS-30D y no en células no tumorales como los hepatocitos, ya que la HPI controla la glucólisis en las células AS-30D pero no en los hepatocitos. Esta predicción se validó experimentalmente, y se observó que el oxamato no produjo ninguna reducción en el

flujo glucolítico ni acumulación de Fru 1,6 BP en hepatocitos de rata (Tabla 2), pero si afecto la glucólisis en las células tumorales AS-30D debido a la acumulación de la Fru 1,6 B (Marín-Hernández et al., 2014; 2020).

Tabla 2. Efecto del oxamato en el flujo glucolítico de hepatocitos y de células tumorales AS-30D de rata.

	AS-30D		Red fed hepatocytes	
	Control	+Oxamate	Control	+Oxamate
% glycolytic flux	100 (5)	48 ± 9 (5)	100 (4)	97 ± 21 (4)
Fru1,6BP (mM)	4 ± 2 (3)	11 ± 3 (3)	1 ± 0.2 (4)	0.3 ± 0.1 (4)

Fuente: Marín-Hernández et al., 2020. BBA. 11:1864.

Por lo anterior, se puede considerar que el uso de este fármaco podría ser una alternativa terapéutica contra el cáncer. Además, con el uso del oxamato es posible establecer si la HPI es una enzima que ejerza control en la glucólisis en las células tumorales humanas de diversos tipos de cáncer, al inducir un incremento en los niveles de Fru1,6BP e inhibir la glucólisis. Así mismo, se puede explorar si otros inhibidores de la glucólisis pueden tener un mecanismo de acción similar al del oxamato y pueden proponerse como alternativas para disminuir el crecimiento de las células tumorales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo, han mostrado que el oxamato inhibe a la glucólisis en células tumorales de rata sin efectos tóxicos en células normales. Por lo anterior, es indispensable evaluar el efecto del oxamato en células tumorales humanas para establecer si la HPI es un sitio de control de la glucólisis en estas células independientemente del tipo de cáncer del que provengan. Esto permitiría diseñar nuevas estrategias terapéuticas basadas en el mecanismo de acción del oxamato.

HIPOTESIS

El oxamato inhibirá la glucólisis en células tumorales humanas si la hexosa fosfato isomerasa (HPI) es un sitio de control de esta vía.

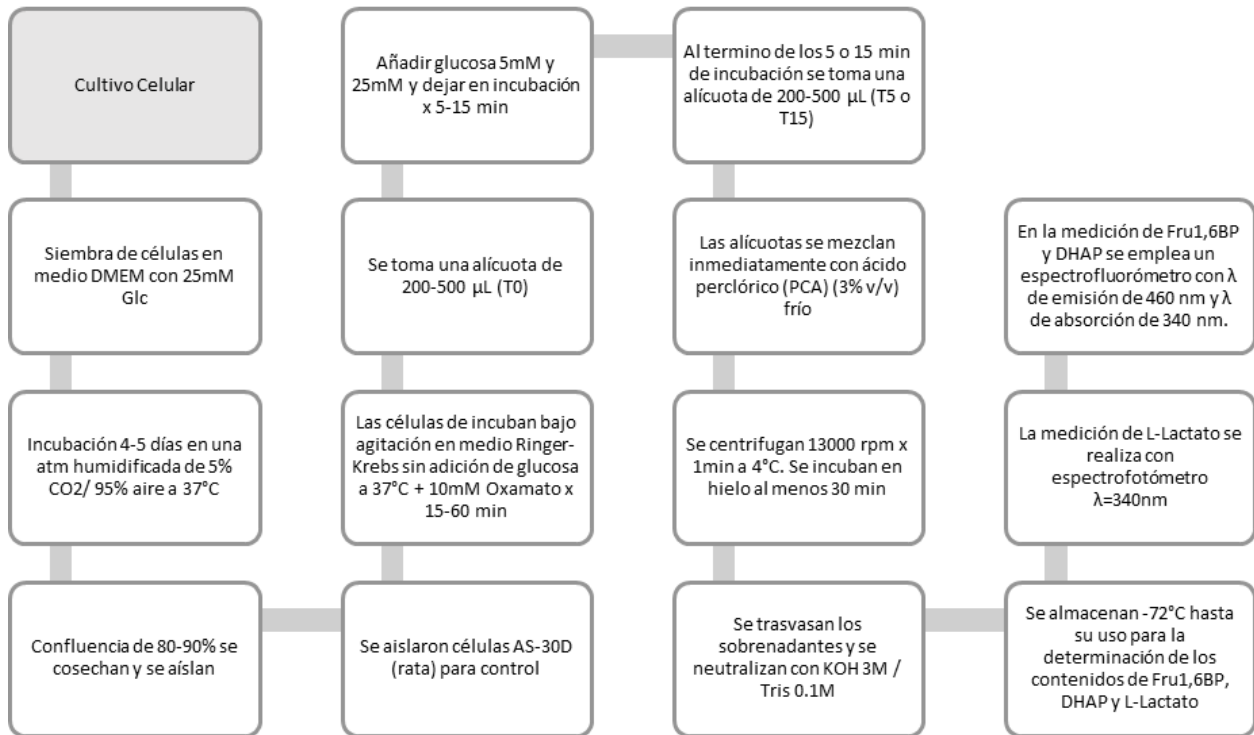
OBJETIVOS

Determinar el efecto del oxamato en la glucólisis en líneas tumorales humanas de diferentes tipos de cáncer.

Determinar los niveles de lactato, Fru1,6BP y DHAP en células tumorales humanas tratadas con oxamato.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de estudio.



Instrumentos

- Campana de flujo laminar
- Incubadora automática de CO₂ de Calor Directo In-VitroCell ES NU-5741
- Centrifuga Hermle z400
- Microcentrífugas Thermo Scientific Sorvall Legend Micro CL 17R
- Sistema de Espectroscopía UV-Visible 8453E Agilent Technologies
- Espectrofluorímetro RF-5301 PC Shimadzu

- Baño de agua digital MaxQ 7000.

Cultivos celulares

Células AS-30D

Ratas hembras Wistar (200-250g de peso corporal), son inoculadas vía intraperitoneal con aproximadamente 4 mL de líquido ascítico que contiene células de hepatocarcinoma AS-30D. Después de 5 a 7 días de la inoculación, las células de hepatocarcinoma del líquido ascítico se recolectan mediante punción intraperitoneal. Para eliminar la contaminación por eritrocitos las células se lavan con el medio Ringer-Krebs. La suspensión celular obtenida se centrifuga 2000 rpm por 2 min. El sobrenadante se desecha y el botón se resuspende en medio Krebs-Ringer (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1,4 mM, KH₂PO₄ 1 mM, HEPES 25 mM, pH 7,4) y se centrifugan por 2 min a 1800 rpm por 2 min. Posteriormente se elimina el sobrenadante y el botón se resuspende nuevamente en medio Ringer-Krebs para volver a centrifugar. Este procedimiento se repite entre 4 a 5 veces y entre cada lavado se disminuye la velocidad de centrifugación 200 rpm, hasta que se han eliminado los eritrocitos contaminantes.

Células tumorales humanas

Las líneas tumorales humanas HeLa (cervical), A-549 (pulmón), U-373 MG (Glioblastoma de cerebro), MDA-MB 268 (mama) y SiHa (cervical) se cultivan en medio Dulbecco-MEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (GIBCO; Rockville, MD, EUA) más 10,000 U de penicilina/estreptomicina (SIGMA; Steinheim, Alemania). La línea no tumoral MCF10A (tejido epitelial de mama), se cultiva en medio Dubelcco-MEM/F-12 suplementado con suero de caballo al 5%, hEGF 20 ng/mL, hidrocortisona 0.5 µg/mL, toxina del colera 100 ng/mL, insulina 10 µg/mL y 10,000 U de penicilina/estreptomicina. Los cultivos se incuban en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ / 95% aire a 37°C hasta alcanzar una confluencia del 80-90%.

Medición del flujo glucolítico y concentración de metabolitos

Se obtienen alícuotas de células tumorales AS-30D con medio Krebs Ringer a una concentración de 15 mg de proteína/mL, mientras que para las líneas humanas se obtienen alícuotas con concentraciones entre 2 y 5 mg de proteína/mL, ambas suspensiones se incuban en agitación constante a 37 °C, sin oxamato (control) o con oxamato 10 mM, durante 15 o 60 min. Al término de la incubación se toma una alícuota de 500 uL (T0) de la suspensión celular. Mientras que a la suspensión celular restante se le adiciona glucosa a 5 mM o 25 mM. Después se vuelven a tomar alícuotas de 500 uL a los 5 o 10 min después de la adición de glucosa. Las alícuotas se mezclan inmediatamente con ácido perclórico frío (PCA) (3% v/v) se incuban en hielo durante al menos 30 min y se centrifugan a 13000 rpm durante 1 min a 4°C. Se trasvasan los sobrenadantes y se neutralizan con KOH 3 M/Tris 0.1 M, y se centrifugan a 13000 rpm durante 1 min a 4°C. Se vuelven a recuperar los sobrenadantes y se almacenan a -72 ° C hasta su uso para la determinación de los contenidos de Fru1-6BP, DHAP y L-lactato.

Cuantificación de L-Lactato

La medición de L-lactato se realiza en medio que contiene Hidrazina 0.4 M-Glicina 0.5 M a pH de 9.0 al que se le adiciona 25 U de LDH y 1 mM de NAD⁺. Después de haberse generado una basal, la reacción se arranca con 30 µL de extracto (Fig. 4). Esta reacción se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm y en una celda de cuarzo de 2 mL. La velocidad del flujo glucolítico se estimó a partir de la diferencia en el contenido de lactato entre las muestras t = 0 y t=5 o t = 10 min, después de la preincubación de 10-60 min con el oxamato.

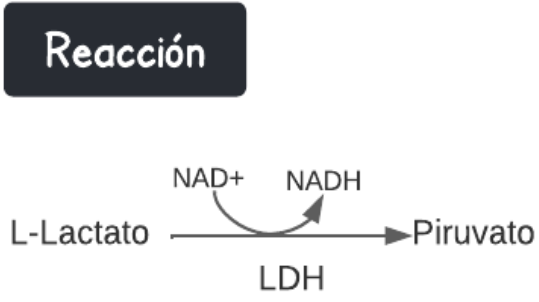


Figura 4. Esquema de la medición de L-Lactato.

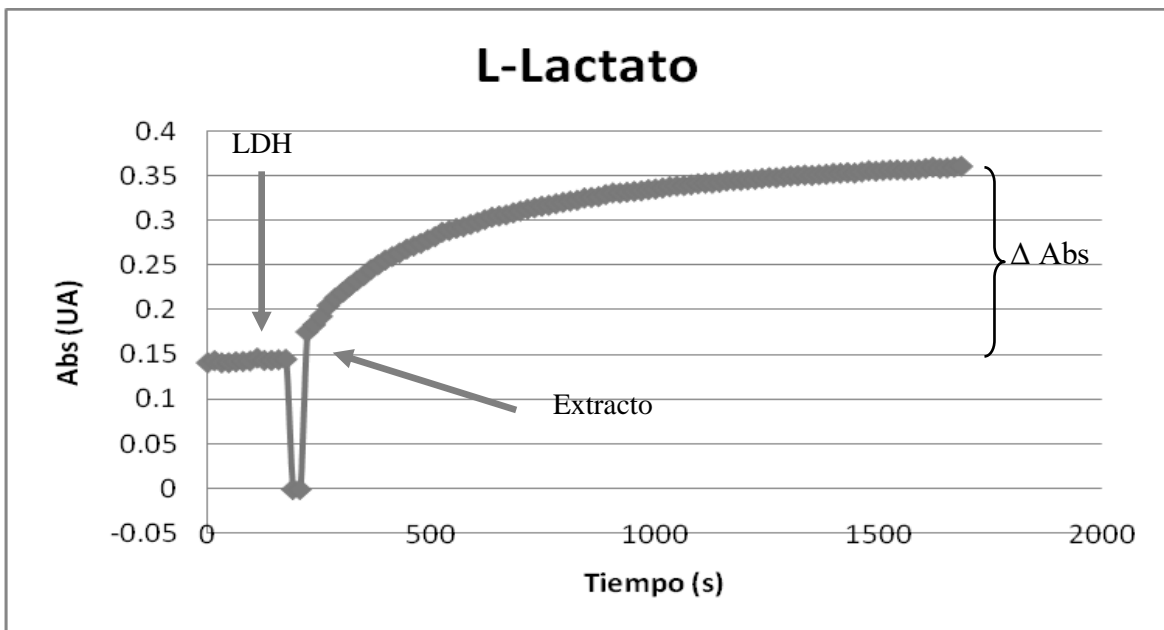


Figura 5. Cuantificación de L- lactato.

Cuantificación de triosas fosfato y Fru 1,6BP

Por otra parte, la medición de las triosas se utilizó el espectrofluorómetro a una λ de emisión de 460nm y λ de absorción de 340nm. En 2 mL de buffer HEPES 10 mM/EGTA 1mM a pH 7.4, se adiciona 150 μ L de extracto y NADH 0.03 mM. Una vez que se genera la basal, se adiciona 2U de α GDH con lo que se determinan los niveles de DHAP, posteriormente se adiciona 5U de TPI con lo que se determinan los niveles de G3P y finalmente se adiciona 1U de ALD para determinar los niveles de Fru1,6BP.

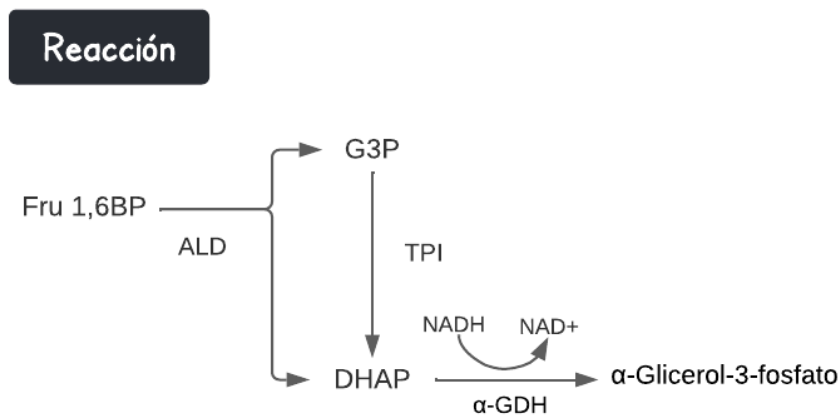


Figura 6. Esquema de la medición de DHAP, G3P y FRU 1,6BP.

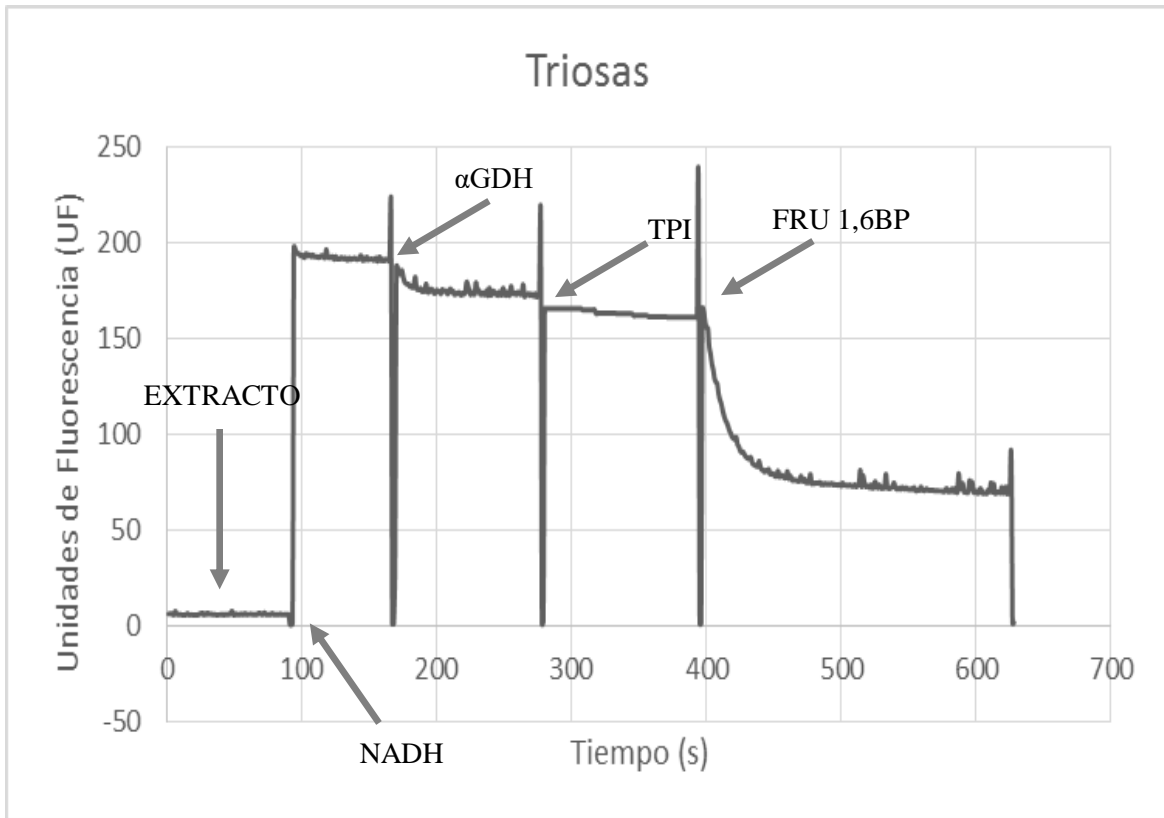


Figura 7. Cuantificación de DHAP, G3P y Fru 1,6BP.

Análisis estadístico

Se empleará la prueba de T de Student para muestras no apareadas considerando una $P \leq 0.05$ como criterio de significancia.

RESULTADOS

Efecto del oxamato sobre la glucólisis en las células tumorales de rata AS-30D

Nuestro grupo previamente había caracterizado el efecto del oxamato en la glucólisis en las células AS-30D (Moreno-Sánchez et al., 2017; Marín-Hernández et al., 2020). Sin embargo, con la finalidad de establecer que el efecto del oxamato sobre la glucólisis no se ve modificado por el tiempo de exposición o la concentración de glucosa. Las células AS-30D se expusieron a 10 mM de oxamato por 15 o 60 minutos y la concentración de glucosa que se empleó para estimular la glucólisis fue 5 o 25 mM (Tabla 3).

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos observar que, en 5 mM de glucosa, la disminución del flujo fue similar a los 15 (33%) y 60 minutos (35%) (Tabla 3). Por otra parte, a los 15 minutos de incubación con oxamato se observó que la inhibición en el flujo glucolítico en 5 mM (33%) es menor que a 25 mM (62%) de glucosa, aunque faltan realizar más determinaciones a 25 mM de glucosa para confirmar este resultado. Estos resultados sugieren que el tiempo de exposición no influye en el efecto del oxamato y que posiblemente la concentración de glucosa podría modificar el efecto del oxamato.

En la condición de 5 mM de glucosa, la disminución en la glucólisis correlaciono con un incremento en la concentración de DHAP (2.6 veces) y Fru1,6BP (2.4 veces) en células tratadas con oxamato con respecto a las células control (Tabla 3), esto indica que en las células tumorales de rata (AS-30D), la glucólisis es inhibida por el oxamato debido a que la Fru1,6BP y DHAP inhiben a la HK y HPI, que son los sitios que controlan la glucólisis en estas células.

Tabla 3. Efecto del oxamato (10 mM) en la glucólisis de células AS-30D.

Tiempo de incubación	Metabolitos/flujos	Glucosa			
		5 mM		25 mM	
		Control	Oxamato	Control	Oxamato
15 min	Glucólisis	7.2 ± 2 (3) 100%	4.9 ± 1.8 (3) 67 ± 10%#	7.8 (1) 100 %	3.5 (1) 38%
	Glucólisis	7.7 ± 1.9 (3) 100%	4.6 ± 1.4 (3) 65 ± 10%#	N.D.	N.D.
60 min	DHAP	1.9 ± 0.2 (3)	4.3 ± 2.1(3) 2.6 ± 1*	N.D.	N.D.
	Fru1,6BP	2.7 ± 1.4 (3)	5.3 ± 2.6 (3) 2.4 ± 1.1*	N.D.	N.D.

El flujo de la glucólisis esta reportado en nmol/min*mg de proteína celular y la concentración de metabolitos en nmol/mg de proteína celular. ND, no determinado. El número de repeticiones independientes se encuentra en paréntesis.

*Número de veces que incrementó la DHAP y Fru1,6BP. #P ≤ 0.05 vs células control.

Efecto del oxamato en la glucólisis de células tumorales humanas

El siguiente paso fue evaluar el efecto del oxamato en la glucólisis de células tumorales humanas. Para ello se empleó inicialmente la línea celular humana de cáncer cervicouterino HeLa, que en estudios previos de nuestro grupo (Marín-Hernández et al., 2011; 2014) se reportó que el flujo de la glucólisis es controlado por la HPI (Marín-Hernández et al., 2011; 2014). Por lo anterior, se consideraba que el oxamato inhibiría la glucólisis en estas células.

Cuando se estimuló la glucólisis con 5 mM de glucosa, el flujo glucolítico en las células HeLa tratadas con oxamato por 15 minutos disminuyó 64% en comparación con las células control. Esta disminución en la glucólisis estuvo asociada con un incremento en la concentración de DHAP y de la Fru1,6BP de 1.8 y 2.3 veces respectivamente, en las células tratadas (Tabla 4). Un efecto similar se observó, cuando la glucólisis se estimuló con 25 mM de glucosa. El flujo glucolítico disminuyó 49% y las concentraciones de la DHAP y la Fru1,6BP aumentaron 2.1 y 2.3 veces en las células tratadas (Tabla 4). Estos resultados nos indicaron que el oxamato inhibe la glucólisis en las células en las que la HPI ejerce un control en el flujo glucolítico.

Tabla 4. Efecto del oxamato 10 mM sobre la glucólisis en células HeLa.

Línea celular	Metabolitos/flujos	Glucosa			
		5 mM		25 mM	
		Control	Oxamato	Control	Oxamato
HeLa	Glucólisis	12.7 ± 7.1 (3) 100%	3.7 ± 0.4 (3) 36 ± 18% [#]	8.4 ± 3.2 (4) 100%	4.2 ± 1.3 (4) 51 ± 8% [#]
	DHAP	1.6 ± 0.6 (3)	2.8 ± 1.3 (3) 1.8 ± 0.5 [*]	1.5 (2)	3.3 (2) 2.1 [*]
	Fru1,6BP	4.7 ± 4 (3)	12 ± 12 (3) 2.3 ± 0.5 ^{*#}	3.4 ± 1.6 (3)	7.0 ± 3.2 (3) 2.3 ± 0.6 ^{* #}

El flujo de la glucólisis esta reportado en nmol/min*mg de proteína celular y la concentración de metabolitos en nmol/mg de proteína celular. El número de repeticiones independientes se encuentra en paréntesis. *Número de veces que incrementó la DHAP y Fru1,6BP. [#]P ≤ 0.05 vs células control

Por este motivo se evaluó el efecto del oxamato en la glucólisis de diferentes líneas celulares tumorales humanas, con la propuesta de que en aquellas células en donde la HPI ejerce control se observaría una disminución en glucólisis. Después del tratamiento con oxamato por 15 minutos y con la adición de 25 mM de glucosa para estimular la glucólisis; en las células MDA-MB-268 (adenocarcinoma de mama), U-373 MG (Glioblastoma de cerebro) y SiHa (carcinoma de cérvix) se observó una disminución en el flujo de la glucólisis de 69, 85 y 71% que correlaciono en el caso de MDA-MB-268 y U-373 MG con un incremento de 3.6 a 4 veces en la concentración de la Fru1,6BP en comparación con las células control (Tabla 5), mientras que en el caso de SiHa no se observó un incremento significativo en la concentración de Fru1,6BP. Esto ultimó sugiere que en las células SiHa el oxamato inhibe la glucólisis por un mecanismo diferente.

Por otra parte, en las células A-549 (cáncer de pulmón) la disminución en la glucólisis fue de solo 19% y la Fru1,6BP se incrementó 2 veces (Tabla 5), Sin embargo el análisis estadístico nos arroja que ni en el flujo glucolítico ni en el aumento en la concentración de Fru1,6BP se observa una diferencia significativa, por lo tanto, se sugiere que en las células A549, la HPI podría no ejercer control sobre el flujo de la glucólisis.

Por lo anterior podemos sugerir que en las líneas celulares MDA-MB-268 (adenocarcinoma de mama) y, U-373 MG (Glioblastoma de cerebro) la HPI ejerce control sobre el flujo.

Tabla 5. Efecto del oxamato en la glucólisis de líneas celulares tumorales humanas

Línea celular	Metabolitos/flujo	Glucosa 25 Mm	
		Control	Oxamato
MDA-MB-268	Glucólisis	11.1 ± 4 (3) 100%	2.7 ± 2 (3) 31 ± 26%#
	Fru1,6BP	4 ± 3.9 (3)	10 ± 6 (3) 3.6 ± 2*
U373	Glucólisis	11 ± 3 (4) 100%	1.1 ± 1 (4) 15 ± 2.8%#
	Fru1,6BP	2 ± 3 (4)	16 ± 7 (4) 4 ± 2*
SiHa	Glucólisis	8.3 ± 2 (5) 100%	2 ± 06 (5) 29 ± 10.7%#
	Fru1,6BP	2.2 ± 1 (5)	2.8 ± 1.2 (5) 1.6 ± 1.2*
A-549	Glucólisis	7.2 ± 2 (4) 100%	5.6 ± 2.4 (4) 81 ± 36%
	Fru1,6BP	1.9 ± 1 (4)	3.6 ± 2 (4) 2 ± 0.7*

El flujo de la glucólisis esta reportado en nmol/min*mg de proteína celular y la concentración de metabolitos en nmol/mg de proteína celular. El número de repeticiones independientes se encuentra entre paréntesis. *Número de veces que incrementó la DHAP y Fru1,6BP. #P ≤ 0.05 vs células control.

Efecto del oxamato en la glucólisis de células normales humanas

Con base al antecedente de que en el modelo de rata se reportó que la HPI no ejerce control en células normales (hepatocitos) y que por ello no fueron sensibles al efecto del oxamato (Marín-Hernández et al., 2020). El efecto del oxamato se evaluó en la línea celular MCF-10A, que son células epiteliales no tumorales de tejido mamario. Para ello determinamos la producción de lactato a diferentes tiempos y concentraciones de glucosa, para establecer el tiempo en el que la producción de lactato era lineal. Como se observa en la figura 8 a partir de los 5 minutos la producción de láctico es lineal hasta los 20 min, por ello en los siguientes experimentos se determinó la producción de lactato a los 10 minutos después de la adición de la glucosa para poder calcular la velocidad de la glucólisis en presencia o en ausencia de oxamato.

Las células MF10A tratadas con oxamato mostraron una disminución en el flujo glucolítico del 54% con 5 mM de glucosa y de 30% con 25 mM de glucosa. Los niveles de Fru1,6 BP aumentaron 4.7 veces con 5 mM de glucosa y 3.5 veces con 25 mM de glucosa con respecto a las células no tratadas (Tabla 6). Este resultado sugiere que la HPI es un sitio de control en la glucólisis de las células normales de mama (MCF-10A) como lo es en las células tumorales humanas.

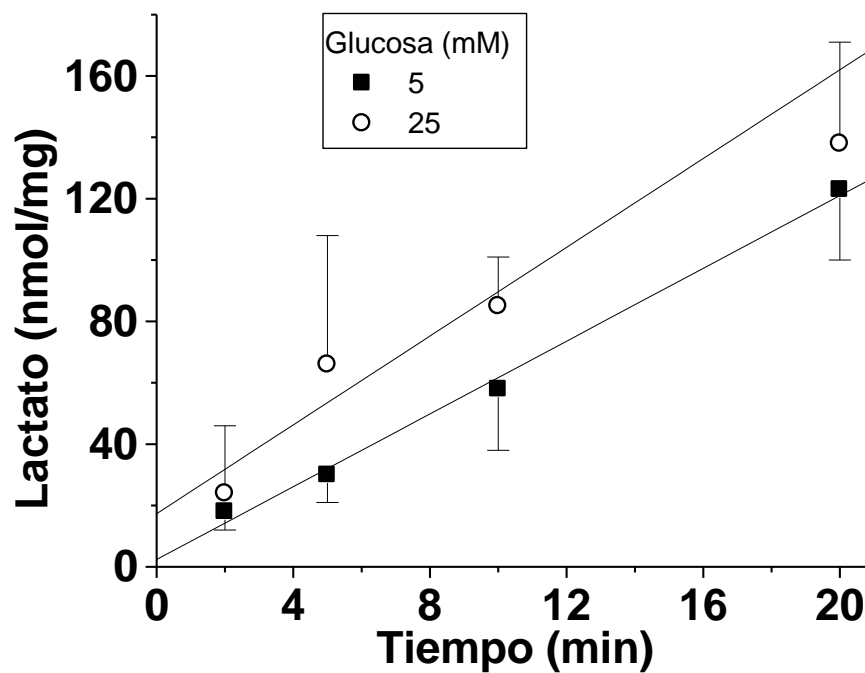


Figura 8. Producción de lactato en las células MCF-10A con respecto al tiempo. La suspensión de células MCF-10A se pre-incubó 10 minutos, al término de este tiempo se adiciono 5 o 25 mM de glucosa. Después de la adición de la glucosa, la cantidad de lactato producido se determinó a los 2.5, 5, 10 y 20 minutos. El número de experimentos independientes fue de 3.

Tabla 6. Efecto del oxamato en la glucólisis de células MCF 10A

Línea celular	Metabolitos/flujos	Glucosa			
		5 mM		25 mM	
		Control	Oxamato	Control	Oxamato
MCF-10A	Glucólisis	18.4 ± 5 (5) 100%	8.9 ± 1.1 (3) 44 ± 11%#	12.8 (1) 100%	9 (1) 70%
	Fru1,6BP	3 ± 3 (3)	9.3 ± 11 (3) 4.7 ± 3*	1.8 (1)	6.4 (1) 3.5*

El flujo de la glucólisis está reportado en nmol/min*mg de proteína celular y la concentración de metabolitos en nmol/mg de proteína celular. El número de repeticiones independientes se encuentra entre paréntesis. *Número de veces que incrementó la DHAP y Fru1,6BP. #P ≤ 0.05 vs células control.

Efecto del ácido koningico en la glucólisis de células tumorales

En estudios previos se ha propuesto que la GAPDH y PYK, pueden ser blancos para la inhibir la glucólisis, debido a que su inhibición puede inducir un incremento en la concentración de la Fru1,6BP y la DHAP, lo que provoca la inhibición de la glucólisis (Marín-Hernández et al., 2016).

El ácido koningico (KA), un inhibidor de la GAPDH, se evaluó en la glucólisis de las células AS-30D (Tabla 7). Las células se trataron por 60 minutos con 3 o 6 μM de KA. Ambas concentraciones indujeron una disminución en el flujo glucolítico de 53 % y 89 % que correlaciono con un incremento de 2 a 8.6 veces en los niveles de DHAP y Fru1,6BP (Tabla 7).

En células HeLa el KA a 3 μM inhibió la glucólisis entre un 40 a 52 % a 5 y 25 mM de glucosa, que correlaciono con un aumento en la concentración de Fru1,6BP y DHAP (Tabla 8). Con 6 μM de KA el flujo disminuyó alrededor de un 60 % en ambas condiciones de glucosa, asociado a un incremento en los niveles de Fru1,6BP y DHAP. Por lo que se puede sugerir que el KA puede inhibir la glucólisis de manera similar que el oxamato, debido a que induce un incremento en la concentración de Fru1,6BP que inhibe a la HPI.

Tabla 7. Efecto del ácido Koningico (KA) sobre la glucólisis en las células AS-30D.

Línea celular	Metabolitos/flujo	Ácido Koningico			
		3 μ M		6 μ M	
		Cont rol	KA	Control	KA
AS-30D	Glucólisis	4.5 (1)	2.1(1)	5.2 \pm 2.1 (3)	0.5 \pm 0.4 (3)
		100%	47%	100%	11 \pm 5.8%#
	DHAP	2.6 (1)	5.4 (1) 2.1*	1.5 (2)	9.4 (2) 6.3*
	Fru1,6BP	4.0 (1)	11.5 (1) 2.8*	2.7 (2)	23.3 (2) 8.6*

El flujo de la glucólisis está reportado en nmol/min*mg de proteína celular y la concentración de metabolitos en nmol/mg de proteína celular. El número de repeticiones independientes se encuentra entre paréntesis. *Número de veces que incrementó la DHAP y Fru1,6BP. #P \leq 0.05 vs células control

Tabla 8. Efecto del ácido Koningico (KA) sobre la glucólisis en las células HeLa

Concentración de KA	Metabolitos/flujos	Glucosa			
		5 mM		25 mM	
		Control	KA	Control	KA
3 μM	Glucólisis	4.9 \pm 3.1 (3) 100%	3.1 \pm 3.9 (3) 48 \pm 36%	15.8 \pm 4 (4) 100%	9.2 \pm 2 (4) 60 \pm 11.5%#
	DHAP	0.13 \pm 0.22(3)	0.5 \pm 0.3 (3) 0.9 \pm 0.4*	0.2 \pm 0.3 (4)	1.5 \pm 1.7 (4) 1.6 \pm 1.7*
	Fru1,6BP	2.3 \pm 3.5 (3)	3.5 \pm 3.2 (3) 5.3 \pm 3.7*	4.5 \pm 4.2 (4)	7 \pm 4 (4) 4 \pm 5.6*
6 μM	Glucólisis	7.6 \pm 4.1 (5) 100%	4 \pm 4 (5) 38 \pm 40%#	11.2 \pm 6.2 (5) 100%	3.2 \pm 2 (5) 35 \pm 25%#
	DHAP	0.7 \pm 1.1 (4)	5 \pm 3.8 (4) 4 \pm 2*	0.7 \pm 1.1 (4)	4 \pm 3 (4) 3 \pm 1.5*
	Fru1,6BP	4.5 \pm 5 (4)	11 \pm 9.1 (4) 8 \pm 7.4*	6.6 \pm 4.2 (4)	12.4 \pm 7.5 (4) 4.4 \pm 5.8*

El flujo de la glucólisis esta reportado en nmol/min*mg de proteína celular y la concentración de metabolitos en nmol/mg de proteína celular. El número de repeticiones independientes se encuentra entre paréntesis. Número de veces que incrementó la DHAP y Fru1,6BP. #P \leq 0.05 vs células control.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Estudios previos del grupo han demostrado que el efecto inhibitorio del oxamato en la glucólisis tumoral, es mediado por la inhibición de varios sitios de la vía como la LDH, la PYK y la ENO que inducen la acumulación de Fru1,6BP y DHAP, que son inhibidores de la HK y preferentemente de la HPI, enzimas que controlan el flujo de la vía en células tumorales (Marín-Hernández et. al., 2016). Debido a que las células tumorales presentan una glucólisis acelerada en comparación con las células no tumorales, La inhibición de la glucólisis puede proponerse como una estrategia terapéutica.

En este trabajo comenzamos evaluando el efecto del oxamato en células tumorales de rata (AS-30D) porque en estudios previos se ha reportado que el flujo glucolítico lo controla principalmente la HK, la HPI y el transportador de glucosa e interesantemente las simulaciones realizadas con modelos cinéticos, mostraron que al inhibir al mismo tiempo estos sitios de control, se observan efectos negativos sobre la glucólisis tumoral (Marín-Hernández et. al., 2010). Los resultados indican que el tiempo de exposición y la concentración de glucosa no influyen en el efecto inhibitorio del oxamato.

Para extender nuestros estudios, también se evaluó el efecto del oxamato en células tumorales humanas (HeLa), en donde ya se ha reportado (Marín-Hernández et. al., 2010; 2016) que la HPI es la enzima que ejerce control sobre el flujo glucolítico, junto con la HK y el transportador de glucosa. En vista de que hubo una disminución del flujo glucolítico que correlaciono con un aumento de la Fru1,6BP, nos permitio validar que en las células donde controla la HPI el oxamato inhibe la glucólisis.

Por lo tanto, para determinar indirectamente si la HPI podría ser el sitio de control en diferentes líneas celulares tumorales humanas usamos el oxamato como herramienta. De tal forma que al disminuir el oxamato el flujo glucolítico y aumentar la Fru1,6BP (Tabla 5) en las células U-373 MG (Glioblastoma de

cerebro) y MDA-MB-468 (adenocarcinoma de mama), sugiere que, en estas líneas celulares la HPI ejerce control sobre el flujo glucolítico.

Sin embargo, no se descarta que también esta disminución en el flujo glucolítico se atribuya a la inhibición de la HK, que se ha descrito en estudios previos, como un sitio de control de la glucólisis en líneas celulares tumorales de cerebro (Marie y Shinjo, 2011). Lo que correlaciona con que se reporte que el oxamato a partir de concentraciones de 20 mM disminuye el flujo glucolítico en otras líneas celulares tumorales de cerebro (UW402, DAOY, Res256) (Valvona y Fillmore, 2018), aunque en estos ensayos se expusieron a las células por 24 horas al oxamato. Aunque, en líneas celulares tumorales de mama (4T1, MDA-MB-231, MCF-7), se sugiere que uno de los sitios de control es el transportador de glucosa GLUT (Varghese et. al., 2020; Shin y Koo, 2021), nuestro estudio sugiere que también la HPI puede ser un sitio de control en las células de este tipo de cáncer. En el caso de las células de cáncer de pulmón (A-549), no se observa un cambio significativo en el flujo de la glucólisis, aunque hay un aumento en la concentración de Fru1,6BP. Esto podría indicar que al menos para esta línea celular, la HK y la HPI no son sitios de control en la glucólisis, porque, aunque hay aumento en la concentración de Fru1,6BP, el flujo glucolítico no cambia significativamente. Además, no se descarta que esta baja sensibilidad al oxamato se deba a la resistencia que tienen estas células a inhibidores de la LDH (Yang et. al., 2014). Además, en otro estudio realizado con diferentes líneas celulares tumorales de pulmón (Qiao et al., 2021), incluida las células A-549, se observa que la glucólisis disminuye a concentraciones de 60-100 mM de oxamato después de 24 horas, sin embargo, por la exposición prolongada el metabolismo de la glucosa se puede ver afectado por un mecanismo diferente, por lo que se sugiere realizar ensayos aumentando la concentración de oxamato, pero manteniendo el tiempo de incubación establecido en esta tesis.

En el caso de las células SiHa, aunque fue evidente una disminución en la glucólisis inducida por el oxamato, esta disminución no estuvo asociada con un

incremento en la Fru1,6BP, por lo que es necesario hacer mas estudios para establecer el mecanismo de esta inhibición.

Como se demostró por nuestro equipo de trabajo, la hexosa-6-fosfato isomerasa (HPI) ejerce un control significativo sobre el flujo glucolítico en las células tumorales, pero no en los hepatocitos. Por lo que el flujo glucolítico disminuyó inducido por el oxamato, solo en células AS-30D y no en hepatocitos porque la HPI fue inhibida por el aumento de la Fru1,6BP y DHAP (Marín-Hernández, et. al. 2020).

Considerando estos antecedentes, se ensayó con células MCF-10A que son células normales epiteliales de mama. Sin embargo, el flujo glucolítico disminuyó y la concentración de Fru1,6BP aumentó, lo que indica que en las células MCF-10A la HPI ejerce un control significativo en el flujo glucolítico.

Por otra parte, usamos otro inhibidor de la vía glucolítica, como el ácido kóningico (KA), que estudios previos (Ganapathy-Kanniappan, 2018), ha demostrado su especificidad y eficacia hacia la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El KA inactiva a la GAPDH mediante la unión covalente a un residuo de cisteína en el sitio activo de la enzima (Rahier et. al., 2015). Al inhibir a esta enzima se induce el aumento de la concentración de la Fru1,6BP generando la disminución del flujo glucolítico, lo que se ha visto en células de cáncer de tiroides (C643) a una concentración de 4 μ M, donde la producción de lactato disminuye un poco más del 50% (Rahier et. al., 2015). Comparando los resultados del ensayo anterior y los de este trabajo, podemos observar que en las células AS-30D tratadas con KA hay una disminución significativa del flujo glucolítico y un aumento de la Fru 1,6BP y DHAP, lo que sugiere que si se estaría inhibiendo la actividad de la HPI. Mecanismo propuesto por nuestro grupo de trabajo para compuestos que inhiban a la GAPDH, enolasa y piruvato cinasa (Marín Hernández et al., 2016).

CONCLUSIONES

- En las células tumorales AS-30D, así como en las células humanas HeLa, U373 MG, MDA-MB-468 y MCF-10A la HPI es un sitio de control de la glucólisis.
- La HPI podrían no ser un sitio de control en las células tumorales humanas A-549 y SiHa.
- El KA inhibe la glucólisis debido a que la acumulación de la Fru1,6BP y DHAP que inhiben a la HPI.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan a 3 direcciones.

En primer lugar, se propone caracterizar el mecanismo por el cual la glucólisis es inhibida por el oxamato en las células tumorales SiHa. En segundo lugar, caracterizar el efecto del oxamato en otras células tumorales y no tumorales. Por último, evaluar el efecto del ácido koningico en otras líneas celulares tumorales y no tumorales. Para establecer si la disminución del flujo glucolítico está asociada con la inhibición de la HPI.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. (2018). Cancer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Sociedad Mexicana de Oncología. (2016). Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer. <https://www.smeo.org.mx/>
3. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. <https://www.inegi.org.mx/>
4. INFOCANCER. (2019). El cáncer en el mundo y México. <http://www.infocancer.org.mx/?c=conocer-el-ancer&a=estadisticas-mundiales-y-locales#sup4>
5. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2021). Efectos secundarios del tratamiento contra el cáncer. <https://www.cdc.gov/spanish/cancer/survivors/patients/side-effects-of-treatment.htm>
6. American Cancer Society. (2021). Tratamientos y efectos secundarios <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/efectos-secundarios-fisicos.html>
7. Gonzales GF, Gonzales C, Espinosa D, Rojas C. Sobre expresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas. Acta Médica Peruana. 2007; 24: 187-197.
8. Marín-Hernández A. Control de la glucólisis en células tumorales de rápido crecimiento, Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
9. Pedersen PL Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. Prog. Exp. Tumor Res. 1979; 22:190-274.
10. Valle A y Soto I. Metabolismo Energético y Cancer. VERTIENTES Rev. Esp. En Ciencias de la Salud. 2014; 17:108-113.
11. Marín-Hernández Á. El factor inducido por la hipoxia-1 (hif-1) y la glucólisis en las células tumorales. REB. 2009; 28:42-51.

- 12.** Marín-Hernández Á, Rodríguez-Zavala JS, Del Mazo-Monsalvo I, Rodríguez- Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. Inhibition of Non-flux-Controlling Enzymes Deters Cancer Glycolysis by Accumulation of Regulatory Metabolites of Controlling Steps. *Front Physiol.* 2016; 7:412.
- 13.** Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Del Mazo-Monsalvo I, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S. Assessment of the low inhibitory specificity of oxamate, aminooxyacetate and dichloroacetate on cancer energy metabolism. *Biochem Biophys Acta.* 2017: 3221-3236.
- 14.** Marín-Hernández Á, Gallardo-Pérez JC, Reyes-García MA, et al. Kinetic modeling of glucose central metabolism in hepatocytes and hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020; 1864:129687.
- 15.** Marín-Hernández A, López-Ramírez SY, Del Mazo-Monsalvo I, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. Modeling cancer glycolysis under hypoglycemia, and the role played by the differential expression of glycolytic isoforms. *FEBS J.* 2014; 281:3325-45.
- 16.** Yang Y, Su D, Zhao L, Zhang D, Xu J, Wan J, Fan S, Chen M. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 2014; 5:11886-96.
- 17.** Varghese E, Samuel SM, Líšková A, Samec M, Kubatka P, Büsselberg D. Targeting Glucose Metabolism to Overcome Resistance to Anticancer Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2020; 12:2252.
- 18.** Shin E y Koo J. Glucose Metabolism and Glucose Transporters in Breast Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9:1-18.
- 19.** Marie SK, Shinjo SM. Metabolism and brain cancer. *Clinics (Sao Paulo).* 2011; 66 Suppl 1:33-43.
- 20.** Valvona CJ, Fillmore HL. Oxamate, but Not Selective Targeting of LDH-A, Inhibits Medulloblastoma Cell Glycolysis, Growth and Motility. *Brain Sci.* 2018; 8:56.
- 21.** Qiao T, Xiong Y, Feng Y, Guo W, Zhou Y, Zhao J, Jiang T, Shi C, Han Y. Inhibition of LDH-A by Oxamate Enhances the Efficacy of Anti-PD-1 Treatment

- in an NSCLC Humanized Mouse Model. *Front Oncol.* 2021; 11:632364.
- 22.** Zancan P, Sola-Penna M, Furtado CM, Da Silva D. Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Mol Genet Metab.* 2010; 100:372-8.
- 23.** Ganapathy-Kanniappan S. Evolution of GAPDH as a druggable target of tumor glycolysis? *Expert Opin Ther Targets.* 2018 Apr;22(4):295-298.
- 24.** Rahier N.J., Molinier N., Long C. et al. Anticancer activity of koningic acid and semisynthetic derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2015; 23:3712-3721
- 25.** Nelson, David L., Claudi M. Cuchillo Foix, Albert L. Lehninger, y Michael M. Cox. *Lehninger: Principios De Bioquímica.* 4a. ed. Barcelona: Omega, 2005.
- 26.** Calder PC, Fatty Acids: Metabolism. *Encyclopedia of Food and Health.* Southampton, UK. 2016: 632-644.
- 27.** Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2011 Aug 11;11(9):671-7.
- 28.** Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol.* 2013 Dec 5;4:354.
- 29.** Graham LP. Miscellaneous targets. En: Graham LP, editor. *Antimalarial Agents.* Scotland, United Kingdom: Elsevier; 2020. p. 547-594.
- 30.** Ye W, Zheng Y, Zhang S, Yan L, Cheng H, Wu M. Oxamate Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity via Inhibition of Tissue Lactate Production in db/db Mice. *PLoS One.* 2016; 11:e0150303.
- 31.** Zeczycki TN, Maurice MS, Attwood PV. Inhibitors of Pyruvate Carboxylase. *Open Enzym Inhib J.* 2010; 3:8-26.
- 32.** Arioli S, Zambelli D, Guglielmetti S, De Noni I, Pedersen MB, Pedersen PD, Dal Bello F, Mora D. Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79:376-80.
- 33.** Pedersen PL. Warburg, me and hexokinase 2: multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg*

Biomembr. 2007; 39:211-222.

34. Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*. 2006; 25:4683-4696.

35. Roberts DJ, Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ*. 2015 Feb; 22:248-57.

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

37. Lee JH, Jeffery CJ. The crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with D-sorbitol-6-phosphate, an analog of the open chain form of D-glucose-6-phosphate. *Protein Sci*. 2005; 14:727-734.

38. Arsenieva D, Hardre R, Salmon L, Jeffery CJ. The crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with 5-phospho-D-arabinonohydroxamic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:5872-7.

39. Read J, Pearce J, Li X, Muirhead H, Chirgwin J, Davies C. The crystal structure of human phosphoglucose isomerase at 1.6 Å resolution: implications for catalytic mechanism, cytokine activity and haemolytic anaemia. *J Mol Biol*. 2001; 309:447-63.

40. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*. 2010; 62:315-33.

41. Sandoval-Muñiz RJ, Vargas-Guerrero B, Flores-Alvarado LJ, et al. Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gac Med Mex*. 2016; 152:547-557.

42. Machado-Olano K, Cárdenas-Rodríguez A, Navarro-López E. Transportadores de glucosa: características genéticas, moleculares y fisiopatológicas. *Acta Médica del Centro*. 2019; 13: 584-596.