

713



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LA REGULACION DE LA FOSFOFRUCTOCINASA I TUMORAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA:

OSCAR JUAREZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL MORENO SANCHEZ



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

" La Regulación de la Fosfofructocinasa I Tumoral"

realizado por Juárez Mendoza Oscar

con número de cuenta 9755859-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Rafael Moreno Sánchez

Propietario Dra. Rosario A. Muñoz Clares

Propietario Dr. Juan P. Pardo Vázquez

Suplente Dr. Julio Morán Andrade

Suplente Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

[Handwritten signatures]
Rosario Muñoz Clares
Juan Pardo Pardo ✓
Julio Morán Andrade
Alejandro Zentella Dehesa

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature]



Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

ÍNDICE

Sección	Páginas
Resumen	i
Introducción	
Correlación entre la malignidad del tumor y actividad glicolítica	1
La velocidad glicolítica aumentada y la inducción de enzimas de la glicólisis por oncogenes	2
Las propuestas para explicar la pérdida de efecto Pasteur	4
Actividad incrementada de la bomba Na^+/K^+	5
Pérdida de la compartimentalización de los Adenin Nucleótidos.	7
La creatina cinasa tumoral	8
Contenido mitocondrial bajo y estructura mitocondrial alterada	10
Disminución en el acarreador de piruvato	11
Piruvato deshidrogenasa con actividad reducida	14
Baja actividad de las lanzaderas de equivalentes reductores	15
Actividad gluconeogénica disminuida	16
Actividad incrementada de los acarreadores de glucosa	16
La gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	18
Alta actividad de la lactato deshidrogenasa	19
La hexocinasa tumoral	22
Actividad incrementada de PFK-II	23
La piruvato cinasa tumoral	24
La PFK-I como posible sitio de la pérdida del efecto Pasteur	24
Las características físicas y cinéticas de la PFK-I	25
La PFK-I y el efecto Pasteur	26
La pérdida del efecto Pasteur en tumores y la PFK-I	26
Hipótesis y Objetivos	30
Metodología	
Características de la línea tumoral de trabajo	31
Manipulación de la línea tumoral de rápido crecimiento AS-30D	33
Aislamiento y propagación de la línea tumoral	34
Cuantificación de la densidad, viabilidad celular, y la contaminación por eritrocitos	34
Cuantificación del grado del efecto Pasteur	
El grado del efecto Pasteur en la línea AS-30D	34
El coeficiente de Meyerhof y el porcentaje relativo del Efecto Pasteur	34
Determinación de la velocidad glicolítica	35
Determinación de la velocidad de la fosforilación oxidativa	37

Determinación de la concentración intracelular de los efectores de la fosfofructocinasa	
Incubación de las células tumorales AS-30D	37
Extracción de la muestra	38
Determinación del contenido intracelular de los efectores de la Fosfofructocinasa	
ATP y fructosa 6-fosfato	38
ADP y AMP	39
fructosa 1,6-bifosfato y fructosa 2,6-bifosfato	39
Citrato	40
Fosfato	40
Medición del pH intracelular	42
Determinación de los parámetros cinéticos de la Fosfofructocinasa tumoral	43
Determinación de la V_m y K_s para la fructosa 6-fosfato y ATP	44
Determinación de la constante de disociación de los efectores de la PFK I	45
Determinación del efecto del pH sobre la V_m de la PFK I	47

Resultados

El grado de efecto Pasteur en la línea tumoral AS-30D	48
La concentración intracelular de los ligandos de la PFK I	
fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato	50
Adenin nucleótidos	51
Iones inorgánicos	
pH	54
fosfato	54
Citrato	55
Propiedades cinéticas de la PFK I tumoral	56
V_m y K_s por sus sustratos	57
Afinidad por efectores alostéricos	57
Efecto del pH sobre la actividad de la enzima	63
Coefficiente de saturación hacia sus ligandos	65

Discusión

El grado de efecto Pasteur en la línea tumoral AS-30D	67
La concentración intracelular de los ligandos de la PFK I	
fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato	67
Adenin nucleótidos	69
Iones inorgánicos	72
fosfato	73
pH	74
Citrato	75

Propiedades cinéticas de la PFK I tumoral	76
V_m y K_s por sus sustratos	77
Propiedades regulatorias de la PFK I tumoral	77
Efecto del pH sobre la actividad de la enzima	78
Coeficiente de saturación hacia sus ligandos	79
La actividad <i>in situ</i> de la PFK I tumoral	80
La regulación de la PFK I tumoral <i>in situ</i>	82
Conclusión	85
Perspectivas	86
Apéndice:	
La deducción de la ecuación de velocidad de la PFK I	89
Bibliografía	97

Resumen

La transformación neoplásica induce un rearrreglo general de la célula que la sufre. Dentro de estos reajustes se encuentran, entre otros, el cambio en el metabolismo energético. El incremento en la velocidad neta de la glicólisis, la disminución en la respiración celular y la pérdida del efecto Pasteur son las características más prominentes del metabolismo de una célula tumoral.

En el caso de la pérdida del efecto Pasteur se desconoce el mecanismo bioquímico por el cual este tipo de células no presentan este fenómeno, aunque se ha sugerido varias propuestas para explicarlo. Sin embargo, estas propuestas no toman en cuenta el mecanismo subyacente del efecto Pasteur.

Para que el efecto Pasteur tenga lugar se deben cumplir dos condiciones: 1) la PFK I debe presentar un alto coeficiente de control de flujo y 2) esta enzima es capaz de cambiar su actividad en la transición aeróbica de la glicólisis.

Propusimos entonces que alguna de estas dos condiciones no se cumplen en una célula tumoral y por eso se pierde el efecto Pasteur.

Determinamos que el grado del efecto Pasteur en la línea tumoral de rápido crecimiento AS-30D es de solo el 8.5%, cuya magnitud indica un que este fenómeno es insignificante en nuestro modelo de estudio.

Analizamos entonces la concentración intracelular de los ligandos más importantes de la PFK I en las condiciones de glicólisis aerobia y anaerobia. Concordando con la ausencia del efecto Pasteur se encontró que la concentración de la fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato, sustrato y producto respectivamente de la PFK I, no cambió.

Los principales efectores alostéricos de la PFK I también fueron determinados. El citrato, ADP y AMP (y la fructosa 1,6-bifosfato) no cambiaron su concentración durante la transición aeróbica de la glicólisis, lo cual hace eco con que no se halla encontrado efecto Pasteur. Sin embargo, algunos efectores como el ATP, el fosfato y el H^+ sí mostraron variaciones importantes en las condiciones evaluadas.

Puesto que el análisis anterior no nos llevó a alguna conclusión clara se analizaron las propiedades cinéticas de la PFK I tumoral, encontrándose algunas alteraciones. La afinidad que esta enzima muestra hacia ambos sustratos se encontró en el intervalo normal, pero la actividad de esta es 17 veces mayor que la reportada para hepatocitos. En el caso de los efectores alostéricos se encontraron algunas diferencias. La enzima tumoral presenta una afinidad hacia el ADP y AMP 3-4 veces mayor, el sitio alostérico del ATP muestra una afinidad 3 veces menor, la afinidad hacia el fosfato es 3-4 veces menor y en el caso de la fructosa 6-fosfato no se pudo encontrar activación alguna. No en todos los casos se encontró una alteración en la afinidad de la enzima hacia sus efectores, en el caso del citrato y la fructosa 2,6-bisfosfato la afinidad es muy semejante a lo encontrado en otras células. Además se determinó el perfil de la actividad de la PFK I tumoral al variar el pH, se encontró que el pK_{es1} es 0.3 unidades de pH menor que el de las células normales. Lo cual explica por que esta enzima, en un pH donde la enzima normal se encontraba 80% inhibida, no cambia drásticamente su actividad.

A partir de estos datos se pudo simular la actividad *in situ* de la PFK I tumoral. Se determinó que esta enzima no cambia su actividad en la transición aeróbica de la glicólisis, que su actividad es 25 veces mayor que el flujo glicolítico y que presenta una cinética global muy diferente a la de una célula normal. De esta manera también se pudieron conocer que mecanismos de regulación no covalente operan en la enzima tumoral *in situ*. Ninguno de los efectores alostéricos de la PFK I es capaz de modular la actividad de esta enzima. En cambio, la disponibilidad de sustrato (fructosa 6-fosfato) y el pH (H^+) son los dos factores más importantes en el control de esta enzima. La PFK I no es un buen candidato para un punto importante de control, ya que hay un exceso de enzima y presenta una elasticidad muy grande con respecto a su sustrato.

Como conclusión, la PFK I tumoral no cumple las dos condiciones necesarias para que se establezca el efecto Pasteur, 1) No cambia su actividad en la transición aeróbica de la glicólisis y 2) No es un buen candidato para un punto importante de control. Este puede ser considerado como el mecanismo de la pérdida del efecto Pasteur.

INTRODUCCIÓN

CORRELACIÓN ENTRE LA MALIGNIDAD DEL TUMOR Y ACTIVIDAD GLICOLÍTICA

En 1926 Otto Warburg puso en evidencia el hecho de que las células tumorales presentan un consumo de glucosa muy alto, tanto en anoxia como en presencia de oxígeno, el cual es en general mucho mayor que el de las células quiescentes normales. También demostró que la tensión relativa de oxígeno no afecta la velocidad de producción de lactato en este tipo de células, es decir, presentan una disminución drástica del efecto Pasteur. Este fenómeno adquirió posteriormente otras denominaciones, como glicólisis aerobia o efecto Warburg (Racker, 1981). Sin embargo, tal comportamiento no es único de las células tumorales. También se presenta en células transformadas, en células quiescentes expuestas a citocinas o a suero y en proliferativas normales (Pedersen, 1978; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992).

Las células tumorales presentan una gran variedad de fenotipos y estados de desdiferenciación; desde aquellos con velocidades de duplicación bajas, altamente diferenciados, siendo muy semejantes a su tejido de origen; hasta las células con velocidades de replicación muy altas, malignas, metastáticas y extraordinariamente desdiferenciadas (Pedersen, 1978; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992). En la figura 1 se observa el comportamiento de la actividad glicolítica con respecto al grado de desdiferenciación del tumor y la velocidad de división celular. Existe una relación muy estrecha entre el grado de desdiferenciación de las células tumorales, su velocidad de división celular y la velocidad neta de la glicólisis; los tumores con mayor grado de desdiferenciación y que se dividen más rápidamente son los que presentan una velocidad glicolítica mayor.

Otro fenómeno que presenta la misma correlación es la pérdida gradual del efecto Pasteur. En general, las células de más rápido crecimiento, mayormente desdiferenciadas y con mayor actividad glicolítica son las que presentan un menor porcentaje de efecto Pasteur; es decir, la velocidad de la glicólisis aerobia y anaerobia son muy similares.

Ya que estas características están relacionadas con el grado de desdiferenciación del tumor pueden, considerarse como Discriminantes Ligadas a la Transformación (DLT), es decir, son características que siguen el patrón de la progresión del cáncer o que están

correlacionadas positiva o negativamente con el grado de malignidad o desdiferenciación del tumor (Weber, 1977a ; Weber, 1977 b).

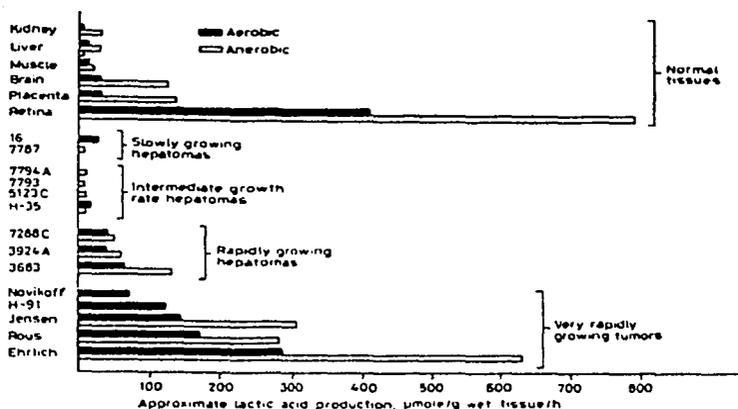


Figura 1. Relación de la actividad glicolítica con respecto al grado de desdiferenciación del tumor y a la velocidad de duplicación celular. En el eje de las ordenadas se presentan los diferentes tipos celulares, clasificados como: tejidos normales, células tumorales de bajo, mediano y rápido crecimiento de arriba hacia abajo. En el eje de las abscisas se presenta la velocidad glicolítica respectiva de cada tipo celular. Las barras claras denotan la velocidad glicolítica anaerobia y la oscura la aerobia. Modificado de Pedersen (1978).

EL AUMENTO EN LA VELOCIDAD GLICOLÍTICA Y LA INDUCCIÓN DE ENZIMAS DE LA GLICÓLISIS POR ONCOGENES

Los tumores de rápido crecimiento presentan una mayor actividad con respecto a los tejidos que les dan origen de todas las enzimas glicolíticas, incluyendo a los transportadores de glucosa y lactato, siendo éste el mecanismo del aumento en la velocidad glicolítica neta (Nakashima *et al.*, 1984; Nakashima *et al.*, 1985; Dang *et al.*, 1999). La manera en que la transformación neoplásica tiene repercusiones sobre los genes del metabolismo energético actualmente se está esclareciendo.

La mayoría de los genes de las enzimas glicolíticas tienen secciones denominadas Elementos de Respuesta a Carbohidratos (ChoRE) -5'-CACGTG-3', cajas E o sitios de

Figura 2A

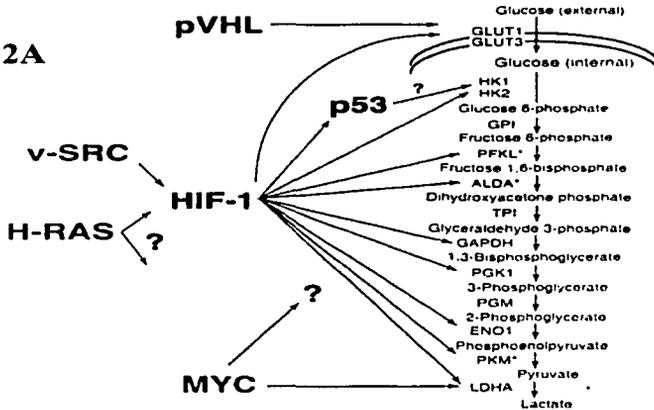


Figura 2B

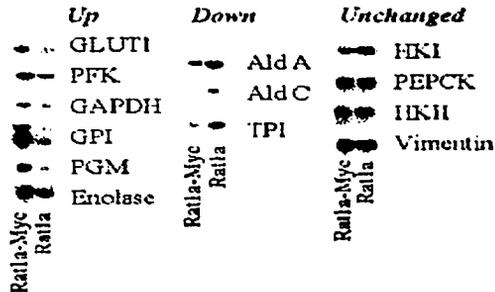


Figura 2. A La regulación genética de las enzimas glicolíticas por los oncogenes RAS, SRC, MYC y por los factores de transcripción que activan, como HIF-1*, genes o isoformas de enzimas con ChoRE. Tomado de Dang *et al.*, 1997. B Inducción de la expresión de enzimas glicolíticas en fibroblastos transformados con el protooncogen activado Myc. Nótese que el nivel de un transcrito del gen de la proteína citoesquelética Vimentina no varía. Rat1a, fibroblastos normales; Rat1a-Myc, fibroblastos transformados con el oncogen Myc. Tomado de Osthus *et al.*, 1994.

unión de Myc/ Max (figura 2A), en particular los de las isoformas que se encuentran en las células cancerosas (Dang *et al.*, 1997, 1999; Semenza, 1998). La regulación normal de la expresión de las enzimas glicolíticas ocurre en función de la concentración de glucosa y oxígeno, y le permite a la célula adaptarse a la anoxia y al estado nutricional (Dang *et al.*, 1997, 1999). Dichas variables inducen o reducen la síntesis o la estabilidad de factores de transcripción como HIF-I, Myc/ Max y USF, que son capaces de unirse a los sitios ChoRE y activar la síntesis de estas enzimas (Dang *et al.*, 1997). En particular HIF-I es regulado por fosforilación dependiente del estado redox (Semenza, 1998).

En células tumorales se ha descrito la expresión constitutiva de HIF-1 (Semenza, 1998). Algunos oncogenes como v-SCR o RAS incrementan la síntesis de éste (Dang, 1999). HIF-1 también es capaz de estabilizar al gen supresor de tumores p53 y funcionar como regulador transcripcional, en particular de la HKII que tiene un secuencia ChoRE y una de respuesta a p53 (Dang, 1999). También es común encontrar altos niveles de Myc/ Max, y versiones alteradas de Myc, el cual es un factor de transcripción que puede activar directamente la transcripción de algunas enzimas de la glicólisis o a HIF-I (Dang, 1999). Como ya se mencionó, estos factores de transcripción incrementan la síntesis de todas las enzimas de la glicólisis (figura 2B), y en mayor proporción la de las enzimas que típicamente controlan la glicólisis (Nakashima, 1985). Esto provoca que el patrón normal de regulación de la vía se pierda.

LAS PROPUESTAS PARA EXPLICAR LA PÉRDIDA DE EFECTO PASTEUR

Como se pudo apreciar se conocen bastante bien los mecanismos por los que en las células tumorales aumenta la velocidad neta de la glicólisis. Sin embargo, el mecanismo bioquímico por el cual éstas pierden el efecto Pasteur es desconocido, aunque se han sugerido varias hipótesis para explicarlo (figura 3).

La propuesta inicial para explicar de este fenómeno corre a cargo de Otto Warburg, aunque como se verá existen varias que se han venido sugiriendo. Warburg propuso que la alta velocidad de glicólisis se debía a defectos en la vía de fosforilación oxidativa. Pensaba que los procesos carcinogénicos eran el resultado de la aceleración de la glicólisis y en la disminución de la respiración celular. Warburg proponía que las deficiencias en la respiración provocaban que la glicólisis se acelerara para compensar la pérdida en la

respiración celular y por lo tanto era necesario que funcionara a altas velocidades aún en condiciones aerobias (Pedersen, 1978; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992).

ACTIVIDAD INCREMENTADA DE LA BOMBA Na^+ / K^+

Estudios realizados por el grupo de Efraim Racker han sugerido que la hidrólisis del ATP es un factor limitante para la glicólisis en células normales y particularmente en tejidos cancerosos.

Este grupo demostró que la glicólisis de las células tumorales ascíticas de Ehrlich puede ser inhibida al adicionar ouabaina (inhibidor de la bomba Na^+ / K^+), quercetina (inhibidor de varias ATPasas citosólicas) o dinitrofenol (desacoplante mitocondrial).

En particular la bomba Na^+ / K^+ llamó mucho la atención del grupo de Racker ya que había demostrado por ensayos indirectos una alta actividad de ATPasa y un bajo transporte de iones a través de la membrana. La bomba fue aislada de células tumorales de Ehrlich y reconstituida en liposomas. Se determinó que la relación Na^+ expulsado/ ATP hidrolizado es de sólo 0.34 para la bomba aislada de células tumorales, mientras que en la bomba aislada de células normales la relación es de 1.6-1.8 (Pedersen, 1978; Racker *et al.*, 1981).

Debido a que la bomba Na^+ / K^+ tiene una alta actividad de ATPasa tanto en ausencia como en presencia de oxígeno, se suscita un aumento en la concentración de ADP y fosfato. Estos metabolitos estimulan a la glicólisis (ya que el "paso limitante" reside en las enzimas que utilizan ADP o fosfato según este grupo) y evitan la regulación negativa por otros efectores de la vía (Pedersen, 1978; Racker *et al.*, 1981; Eigenbrodt *et al.*, 1984; Baggeto, 1992). Por otro lado, se ha descrito que en membranas enriquecidas con colesterol la actividad de bombeo de iones por mol de ATP disminuye en comparación con las no enriquecidas (Baggeto, 1992), indicando que los factores que promueven la ineficacia de la bomba residen tanto en la propia enzima, como en el contenido de colesterol de las membranas.

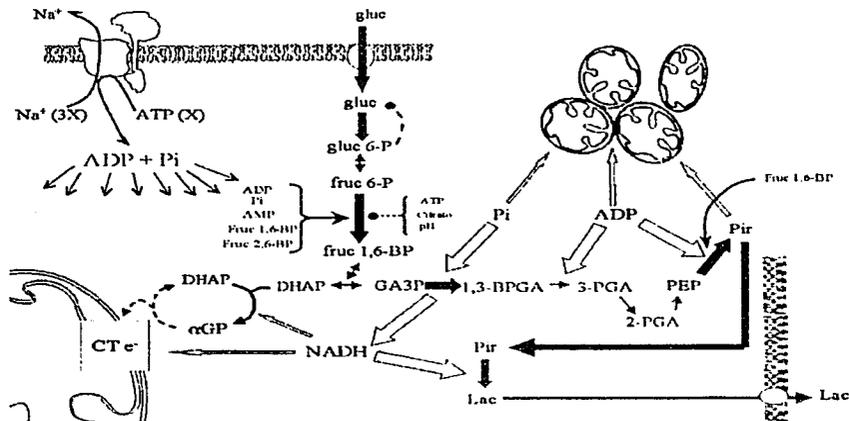


Figura 3. Propuestas para explicar la pérdida del efecto Pasteur en células tumorales. Las flechas verdes indican la secuencia de reacciones de la glicólisis, el grosor de cada una denota el incremento relativo inducido por el estado tumoral en cada enzima. Las flechas amarillas indican flujos de cofactores entre la glicólisis y la mitocondria. Las líneas en azul representan activadores, las rojas inhibidores. Las líneas terminadas en círculo indican que no hay acción significativa de los efectores o que es menor con respecto a las enzimas normales, las líneas terminadas en punta de flecha indican que hay efecto incrementado de los moduladores. CT e^- , cadena transportadora de electrones.

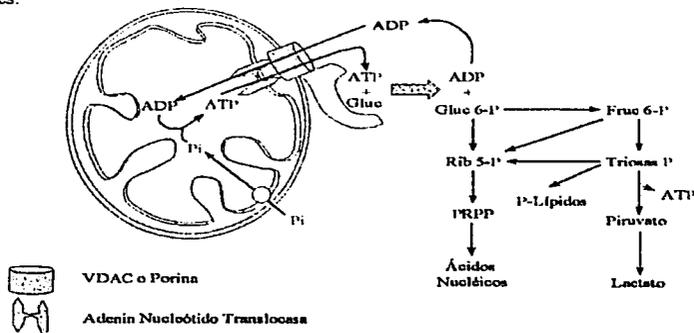


Figura 4. Ubicación de la hexocinasa tumoral y su papel en el metabolismo tumoral.

Sin embargo, la hipótesis de Racker no explica por qué la fosforilación oxidativa no se activa paralelamente al aumentar la actividad de la ATPasa, ya que esta vía, al igual que la glicólisis, usa como sustratos al ADP y al fosfato. Además, se ha demostrado que las enzimas que utilizan ADP y fosfato no regulan de manera significativa el flujo glicolítico en tejidos normales (Rapoport *et al.*, 1976; Kashiwaya *et al.*, 1994; Puigjaner *et al.*, 1997; Jannaschk *et al.*, 1999; Jucker *et al.*, 1999).

PÉRDIDA DE LA COMPARTAMENTALIZACIÓN DE LOS ADENIN NUCLEÓTIDOS. LA CREATINA CINASA TUMORAL

En tejidos normales la mayoría del ADP y del fosfato producidos por el trabajo celular (como el mantenimiento de los gradientes iónicos o la contracción muscular) es aprovechado por la mitocondria para generar ATP.

Puesto que la difusión pasiva del ADP desde el sitio donde se hidroliza el ATP hasta la mitocondria puede ser muy lenta, dada la viscosidad del citosol y la cantidad tan grande de enzimas que unen a este intermediario (Moreno-Sánchez *et al.*, 1997), se requiere que los adenin nucleótidos se microcompartimentalicen en los sitios en donde se produce el ATP (mitocondria) y en donde se consume (ATPasas celulares diversas). En este sistema el "transporte" de los fosfatos de alta energía corre a cargo de la creatina (en forma de fosfocreatina), que fosforilada o no difunde rápidamente en el citosol. De esta manera las enzimas del citosol, como las de la glicólisis, prácticamente no tienen contacto con estos intermediarios (principalmente el ADP) (Baggeto, 1992).

En las células normales los microcompartimentos están constituidos por la adenin nucleótido translocasa y la ATP sintetasa, en la mitocondria, y por la ATPasa respectiva (miofibrilar, plasmática, ribosomal, etc.). El sistema de acoplamiento entre los dos microcompartimentos está dado por la creatina cinasa que se asocia a cada microcompartimento, formando complejos con la ANT y la ATPasa celular (Baggeto, 1992).

En mamíferos se han detectado 4 isoformas de la creatina cinasa: MM (músculo esquelético), BB (en corazón, músculo fetal y cerebro), MB (en músculo esquelético y

cerebro) y CKm (en músculo, corazón y en mitocondrias de cerebro). En células tumorales de rápido crecimiento se ha detectado la presencia de la isoforma fetal BB. Esta isoenzima, a diferencia de las otras, no puede formar complejos con las ATPasas del músculo o las membranales (Baggeto, 1992), aunque se ha visto asociada al espacio intermembranal de la mitocondria (Becker *et al.*, 1989).

Debido a la falta de la microcompartimentalización, los productos de la hidrólisis del ATP incrementan su concentración en el citosol, alimentando a la vía glicolítica o activándola alostéricamente, la cual debido a la actividad incrementada de las enzimas que utilizan ADP y fosfato puede competir exitosamente contra la mitocondria por estos cofactores e inhibir la respiración mitocondrial (Baggeto, 1992). Se ha documentado que las enzimas de la glicólisis que utilizan ADP y fosfato se encuentran muy incrementadas con relación al acarreador mitocondrial de fosfato y a la adenin nucleótido translocasa (ver más adelante). En células tumorales la creatina cinasa parece no estar involucrada en la lanzadera de fosfatos de alta energía, pero puede funcionar como un amortiguador en condiciones donde el ATP disminuye repentina y transitoriamente (Becker *et al.*, 1989; Baggeto, 1992).

CONTENIDO MITOCONDRIAL BAJO Y ESTRUCTURA MITOCONDRIAL ALTERADA

Las células tumorales presentan una pérdida progresiva del contenido mitocondrial (y en la respiración celular) conforme progresan a estadios más malignos. Dicho contenido varía del 100-85% en tumores de lento crecimiento, 85-40 % en los de mediano crecimiento, hasta el 40-20 % en los de rápido crecimiento (Pedersen, 1978; Capuano *et al.*, 1997; Cuezva *et al.*, 1997); mientras que en el hígado fetal disminuye del 50-60% y en el regenerante del 85-65% (Pedersen, 1978). Los tumores de lento crecimiento dependen en una mayor proporción del ATP producido por la mitocondria (Pedersen, 1978); este tipo de tumores consumen ácidos grasos y aminoácidos (Pedersen, 1978) y no presentan una alta velocidad glicolítica aerobia (Sweeney *et al.*, 1963).

Conforme el tumor se vuelve más maligno, la glicólisis se acelera hasta alcanzar velocidades de síntesis de ATP comparables a la de la fosforilación oxidativa (Greenhouse

et al., 1977; Pedersen, 1978; Nakashima *et al.*, 1984; Capuano *et al.*, 1997). La disminución en el contenido mitocondrial puede ser debida a que la biogénesis o la degradación de los organelos es de tipo fetal (Pedersen, 1978; Capuano *et al.*, 1997; Cuezva *et al.*, 1997). Tal como sucede en el hígado fetal, el nivel de los transcritos de todas las enzimas de la fosforilación oxidativa es 5 veces mayor en hepatomas de rápido crecimiento, sin embargo la vida media de los productos es sólo 1/3 al compararlos con el hígado maduro (Capuano *et al.*, 1997).

Al microscopio electrónico las mitocondrias de tumores de lento crecimiento son grandes, con una matriz densa y presentan numerosas crestas, lo cual las hace muy similares a las de los tejidos normales. Las mitocondrias de tumores de rápido crecimiento tienen pocas crestas, una matriz muy clara, y en general son más pequeñas que la mitocondrias normales. Además, pueden tener inclusiones o corpúsculos, y se ha detectado que tienen formas anormales (en forma de copa, aplastadas por el centro, etc). También se ha visto que algunas de éstas no llevan a cabo la transición entre las formas condensada y ortodoxa en presencia de ADP (Pedersen, 1978).

La estructura mitocondrial alterada puede ser debida al contenido de lípidos. En tumores de rápido crecimiento la membrana interna mitocondrial presenta una gran cantidad de colesterol y una la relación fosfolípido/ colesterol reducida, con respecto a las mitocondrias de células normales. Se piensa que este efecto es el resultado de la pérdida del control de la biosíntesis del colesterol (Pedersen, 1978; Baggeto *et al.*, 1991). También se sabe que la composición de las membranas es diferente: hay una disminución en la cardiolipina, en los fosfolípidos polinsaturados, y un aumento en los monoinsaturados, al igual que en los lisofosfolípidos (como monoacilglicerolfosfoetanolamina). Se cree que esto ocurre debido a que las enzimas que sintetizan estos fosfolípidos, como la acil-CoA: 1 acilglicero fosfoetanolamina y fosfocolina transferasa se encuentran incrementadas (Pedersen, 1978).

En mitocondrias de células normales existe evidencia de que ocurre un "chaneling" entre el sitio I, la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa, ya que son capaces de asociarse. Al parecer este complejo es alterado por la enzima málica en algunos tumores (Baggeto, 1992) y por eso la oxidación de los sustratos mitocondriales disminuye. También se ha visto que la cantidad de la subunidad β de la ATP sintetasa se encuentra

disminuida, mientras que en otros componentes no se han encontrado alteraciones. Esto implica una diferencia en el ensamblaje de esta enzima en las células tumorales, que puede conllevar a la pérdida de la capacidad de síntesis de ATP (Pedersen, 1978). En otros laboratorios se ha mostrado que la cantidad de la proteína inhibitoria de la ATP sintetasa (IF-I) se encuentra incrementada, lo cual también podría limitar la síntesis de ATP mitocondrial (Capuano *et al.*, 1997)

A pesar de las diferencias ya señaladas, las mitocondrias de las células tumorales pueden oxidar eficientemente la mayoría de los sustratos mitocondriales clásicos como el glutamato, piruvato, malato, succinato (Pedersen, 1978; Dietzen *et al.*, 1993) o acetoacetato (Briscoe *et al.*, 1994) y tienen controles respiratorios altos, tanto *in vitro* (Pedersen, 1978) como *in situ* (Nakashima *et al.*, 1984). Debido a esto, la creencia de que las mitocondrias de las células tumorales fueran defectuosas ha sido descartada, y actualmente se cree que la disminución en la actividad respiratoria celular es debida a la disminución en el contenido mitocondrial, mas que a los defectos de ellas (Pedersen, 1978).

DISMINUCIÓN EN EL ACARREADOR DE PIRUVATO

La glicólisis aerobia de los tumores ha sido propuesta como el resultado de la poca eficacia de la mitocondria en el transporte del piruvato citosólico (Eboli *et al.*, 1977; Paradies *et al.*, 1983), ocasionado por el contenido bajo de mitocondrias o por la deficiencia del acarreador mitocondrial de piruvato.

En mitocondrias aisladas de células tumorales de diversos tipos se ha determinado que la afinidad del acarreador de piruvato es muy parecida al de células normales, sin embargo la V_m es por lo menos 50% menor que el de las células normales (Paradies *et al.*, 1983). La disminución en el contenido de mitocondrias por célula y la disminución del 50% en el transporte mitocondrial de piruvato dan por resultado sólo un 25% de la capacidad de transporte de piruvato normal. Esta pequeña actividad posiblemente es incapaz de competir contra la lactato deshidrogenasa por el piruvato citosólico, la cual muestra una actividad incrementada (5 U/ mg de proteína celular) (Nakashima *et al.*, 1984). En mitocondrias aisladas de la línea Ehrlich hiperdiploide se ha determinado que la K_s del acarreador por piruvato es la misma que en hígado (630 μ M), sin embargo, la velocidad

máxima de la enzima es alrededor del 40% con respecto a la actividad del hígado. Ya que esta línea presenta sólo un 22 % del contenido mitocondrial hepático, la actividad del acarreador es un orden de magnitud menor que la del tejido normal: 4.28 vs 0.13 $\mu\text{mol}/\text{min}$ gr peso húmedo (Eboli *et al.*, 1977).

Sin embargo, en algunas otras células tumorales se ha determinado que el transporte de piruvato es tan veloz o incluso mayor que el de las mitocondrias de las células que les dan origen, por lo que la disminución en la actividad de transporte mitocondrial del piruvato no parece estar correlacionada con la velocidad de la glicólisis o con la actividad de la fosforilación oxidativa (Eigenbrodt *et al.*, 1985).

PIRUVATO DESHIDROGENASA CON ACTIVIDAD REDUCIDA

En células tumorales, a diferencia de las proliferativas normales, la oxidación de piruvato es muy baja. Esto no implica una disfuncionalidad inherente a las mitocondrias, sino una alteración puntual (Eigenbrodt *et al.*, 1985; Cuezva *et al.*, 1997). En una gran parte de las neoplasias la actividad de la piruvato deshidrogenasa es muy baja, especialmente en aquellas que presentan una velocidad de glicólisis aerobia alta (Paradies *et al.*, 1983; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992), siendo su actividad *in situ* 10 veces menor que la del acarreador de piruvato (Paradies *et al.*, 1983; Baggeto, 1992). Además la isoforma tumoral no sólo es capaz de producir acetil CoA por la descarboxilación oxidativa del piruvato, sino que puede generar de manera no oxidativa acetoina, la cual es el producto de la condensación de acetil CoA y acetaldehído. Este producto es un potente inhibidor competitivo de la PDH tumoral con respecto al piruvato (Baggeto *et al.*, 1987; Baggeto *et al.*, 1990; Baggeto, 1992) y podría tener un papel importante en la inhibición de esta enzima *in situ*. Además, se sabe que la PDH tumoral presenta propiedades cinéticas diferentes a la de las células normales. La PDH de tumores es más sensible a la inhibición por acetil CoA y NADH. La K_i de la enzima hacia el pirofosfato es 3-4 veces mayor que la enzima normal (360 vs 120 μM). Además, la PDH de tumor es activada por AMP, cuyo tipo de activación es V (la V_m aparente aumenta). Se piensa que activa a la PDH en la subunidad encargada de la descarboxilación (E1); este tipo de activación ha sido reportada para PDH embrionarias (Baggeto, 1992).

Se propone que la producción de acetoina es un paso importante en la destoxicación del acetaldehído. En las células tumorales hay un decremento en la actividad de la aldehído deshidrogenasa II (mitocondrial) y un aumento en la IV (citosólica). Esta última tiene una afinidad baja hacia el acetaldehído ya que no toma aldehídos alifáticos, sino aromáticos (Baggeto, 1992). La síntesis de acetoina obedece a la necesidad de la célula tumoral de deshacerse del acetaldehído, que es un compuesto muy tóxico, y lo logra condensándolo con acetyl CoA, siendo el producto altamente difusible. De hecho, se ha encontrado en la sangre de hospederos con cáncer en concentración cercana a 0.6 mM, la cual es semejante a lo encontrado en el dentro del tumor (Baggeto, 1990).

Una característica muy importante del metabolismo de las células tumorales es que el piruvato que se llega a transformar en acetyl CoA no es oxidado totalmente por la mitocondria. El citrato formado es preferentemente expulsado al citosol (figura 4) para sintetizar ácidos grasos o colesterol, en vez de ser oxidado por la mitocondria, como sucede en tejidos normales, en donde el citrato es oxidado en su mayoría (Parlo *et al.*, 1984). Ya que la célula tumoral no es capaz de oxidar piruvato o citrato, se propone que una respuesta adaptativa es depender de otro metabolito de la sección media del ciclo de Krebs para ser oxidado por la mitocondria (Pedersen *et al.*, 1978; Parlo *et al.*, 1984; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992). La principal fuente de energía proveniente de la mitocondria en las células tumorales ocurre por la oxidación de la glutamina, cuyo transporte es por difusión facilitada. En el interior de la mitocondria, la glutamina es ϵ -desaminada y convertida en glutamato por la glutaminasa dependiente de fosfato (Baggeto, 1992). Una vez desaminada y convertida en glutamato, la glutamato/oxaloacetato aminotransferasa transfiere el α -amino del glutamato hacia el oxaloacetato, siendo sus productos α -cetoglutarato, que entra al ciclo de Krebs y aspartato. En las células normales el α -amino es eliminado oxidativamente por la glutamato deshidrogenasa. Sin embargo, ésta enzima está prácticamente ausente en las células tumorales, o la actividad de esta puede ser muy baja debido a la concentración alta de GTP, que es un inhibidor de la enzima (Baggeto, 1992). Esta manera de metabolizar el glutamato ayuda a la célula tumoral a secuestrar el nitrógeno del hospedero para sus propios intereses y es una importante causa de la desnutrición general del paciente canceroso (Baggeto, 1992; Dills, 1993).

La glutamina además de ser oxidada hasta CO_2 , puede generar lactato a través de una vía que por analogía con la glicólisis se ha denominado glutaminólisis (Eigenbrodt *et al.*, 1985, Baggeto, 1992). La glutamina entra como α -cetoglutarato al ciclo de Krebs en donde es convertida en malato, el cual puede seguir por el ciclo hacia oxaloacetato o lo puede tomar la enzima málica y convertirlo de manera oxidativa en piruvato que sale de la mitocondria y es transformado en lactato (Baggeto, 1992; Eigenbrodt *et al.*, 1985).

La enzima málica es sumamente rara en células de mamífero y en células tumorales se encuentra en alta actividad y localizada en la matriz mitocondrial (la isoforma encontrada es la renal), utiliza como cofactor al NADP^+ o al NAD^+ , a diferencia de la enzima normal que usa exclusivamente NADP^+ . Esta enzima tiene algunas propiedades regulatorias como ser activada por succinato, fumarato e isocitrato, mientras que el ADP o ATP se comportan como inhibidores competitivos con respecto al malato (Eigenbrodt *et al.*, 1985). Se ha propuesto que esta enzima cataliza una reacción irreversible en condiciones fisiológicas (Baggeto, 1992), aunque se ha encontrado, tanto en células como en mitocondrias, carboxilación del piruvato en ausencia de ATP (Kelleher, 1987), lo que indica que esta la reacción podría ser reversible.

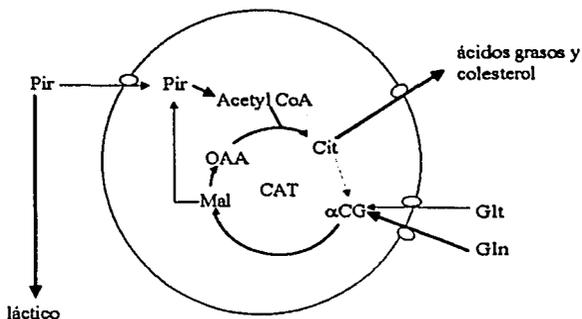


Figura 5. El modelo del ciclo de Krebs truncado de las células tumorales de rápido crecimiento.

BAJA ACTIVIDAD DE LAS LANZADERAS DE EQUIVALENTES REDUCTORES

Boxer y Devlin, a principios de los sesentas (Boxer *et al.*, 1961) describieron que la causa de la glicólisis aerobia tumoral podría ser la ineficacia de las lanzaderas de equivalentes reductores de las mitocondrias tumorales, forzando al NADH a reoxidarse a través de la lactato deshidrogenasa en condiciones aerobias (Golshani *et al.*, 1977). Propusieron que la velocidad de glicólisis alta era una estrategia para compensar la falta de oxidación del NADH por la mitocondria (Grivell *et al.*, 1995).

En una gran cantidad de células tumorales, incluso las altamente glicolíticas, se ha determinado que la actividad de transporte de equivalentes reductores es suficientemente alta como para oxidar el 80% del NADH citosólico, por lo que no se le podría considerar como un paso limitante que forzase al NADH a oxidarse por la lactato deshidrogenasa (Baggeto, 1992; Grivell *et al.*, 1995). De hecho, la actividad de transferencia de electrones por las lanzaderas tumorales es comparable a la de hepatocitos, 0.67 $\mu\text{mol}/\text{min g}$ (Grivell *et al.*, 1995).

Varios estudios ha mostrado que la lanzadera de aspartato/ malato es el sistema más importante de transporte de equivalentes reductores en las células tumorales (Greenhouse *et al.*, 1977; Greehouse *et al.*, 1976). Este sistema contribuye entre 20-33% al consumo celular de oxígeno y a la producción de ATP (Greenhouse *et al.*, 1976; Pedersen, 1978). Kovacevic *et al* (1972) sugirieron que la concentración de aspartato en las células tumorales debería ser muy baja como para que la lanzadera de aspartato/ malato funcione. Sin embargo, la concentración de aspartato es muy alta (4 mM), aún al compararla con la K_m de la Transaminasa de 0.9 mM (Greenhouse *et al.*, 1976; Baggeto, 1992). Dietzen *et al.* (1993) proponen que la enzima málica podría disminuir la concentración de malato, oxaloacetato y aspartato hasta el punto de abatir la actividad de las tranaminasas, y de hecho esto se ha visto en condiciones *in vitro* (Greenhouse *et al.*, 1977). Sin embargo, cuando existe un aporte continuo de glutamina o glutamato no ocurriría esto, ya que estos aminoácidos producen, entre otras cosas, aspartato y oxaloacetato en altas cantidades (Kelleher *et al.*, 1987).

La evidencia más importante de Boxer y Devlin (1961) para pensar que las lanzaderas eran ineficientes es que determinaron en 31 líneas celulares tumorales que no

existía la presencia de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial, lo cual ha sido corroborado en otras líneas y se ha correlacionado con la malignidad del tumor (Greenhouse *et al.*, 1977; Lin, 1977; Pedersen, 1978; Sánchez *et al.*, 1985)

En la mayoría de las células tumorales de rápido crecimiento se ha determinado que la actividad de la lanzadera de glicerol 3-fosfato es nula. Sin embargo, en células ascíticas de Ehrlich alimentadas con glucosa se ha demostrado que los equivalentes reductores pueden pasar por la lanzadera de glicerol 3-fosfato, lo cual demuestra que la actividad de esta depende del sustrato añadido (Grivell *et al.*, 1995). Esta lanzadera puede ser hasta 20 veces más activa en una cepa de Ehrlich que en otra, y sin embargo ambas muestran la misma velocidad glicolítica, lo que descarta la propuesta de Boxer y Devlin.

Se ha sugerido que lanzaderas independientes de transaminación pueden ser funcionales en células tumorales; como la de los ácidos grasos (Greenhouse *et al.*, 1976; Greenhouse *et al.*, 1977; Sánchez *et al.*, 1985). En ésta, el citrato sale de la mitocondria, es escindido por la citrato liasa en oxaloacetato y acetil -CoA. La acetil-CoA entra a la síntesis de lípidos y el oxaloacetato es reducido por la malato deshidrogenasa citosólica e introducido a la mitocondria donde es reoxidado, ocurriendo un transporte neto de electrones al completarse el ciclo.

ACTIVIDAD GLUCONEOGENÉTICA DISMINUIDA

La actividad de la gluconeogénesis es una discriminante ligada a la progresión. Se ha determinado que los hepatomas de Morris de lento y bajo crecimiento presentan velocidades de síntesis de glucosa que van de lo normal a lo moderadamente bajo, mientras que en células tumorales de rápido crecimiento la producción de glucosa es prácticamente nula (Sweeney *et al.*, 1963; Pedersen, 1978; Eigenbrodt *et al.*, 1985). Esto corresponde con la baja actividad de las enzimas de la gluconeogénesis en células tumorales de rápido crecimiento, como la glucosa 6-fosfatasa, fructosa 1,6- bífosfatasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa y piruvato carboxilasa, cuyas actividades son menores al 1% de la actividad encontrada en el hígado (Weber, 1977b). Ya que las enzimas de la gluconeogénesis son prácticamente inexistentes, se propuso que el flujo de la glucosa es forzosamente unidireccional, incrementándose entonces la velocidad aparente de la vía. Sin embargo, esto

implica que el flujo de la reverso de la glicólisis (de piruvato hacia glucosa, es decir el flujo de la gluconeogénesis) cuando hay una alta concentración de glucosa puede ser considerable, siendo inconsistente con las observaciones realizadas a este respecto (Ramanaiah, 1972).

En la mayoría de las células tumorales de rápido crecimiento no se ha encontrado una actividad alta de las enzimas gluconeogénicas. Sin embargo, en las condiciones donde esto se ha ensayado usualmente las células son expuestas o cultivadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (o lo han estado por un tiempo considerable). Se ha determinado que la gluconeogénesis se puede expresar facultativamente dependiendo del sustrato que se añade a las células. Células tumorales de rápido crecimiento cultivadas en aspartato o glutamato incrementan significativamente la síntesis de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa mitocondrial (Eigenbrodt *et al.*, 1985).

ACTIVIDAD INCREMENTADA DE LOS ACARREADORES DE GLUCOSA

En las células tumorales se ha determinado que el transportador de glucosa 1 (GluT1) se encuentra en una gran cantidad, al igual que el tipo 3 (Liong *et al.*, 1997). La afinidad de GluT1 hacia la glucosa es muy similar al transportador de células normales 0.7-1 mM, sin embargo la velocidad máxima es de 3-5 veces mayor que en hígado, 0.25 $\mu\text{mol}/\text{min} \times 1 \times 10^7$ células (Fung *et al.*, 1986). También se ha demostrado que los transportadores de glucosa pueden transportar galactosa al igual que en células normales (Bustamante *et al.*, 1977). La síntesis de los acarreadores de glucosa se incrementa al transfectar a células proliferativas normales con oncogenes como RAS y SRC, pero no con MYC, o al transformar a las células con ésteres de forbol (Nakashima *et al.*, 1991; Birnbaum *et al.*, 1986; Flier *et al.*, 1986).

LA GLICERALDEHÍDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA TUMORAL

La actividad de esta enzima aumenta de manera proporcional al grado de desdiferenciación. La actividad específica oscila entre 6-8 U/ mg proteína en células tumorales de rápido crecimiento (Nakano *et al.*, 1992; Bagui *et al.*, 1999). La importancia

de esta enzima en el control de la vía en tumores reside en que se ha documentado que el metilglicoxal, un metabolito común en la célula, es capaz de inhibir la respiración y glicólisis de las células ascíticas de Ehrlich (Bagui *et al.*, 1999). Se ha propuesto que el efecto ocurre sobre la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ya que *in vitro* la enzima tumoral es inhibida por este metabolito, lo que en la enzima normal no ocurre (Bagui *et al.*, 1999).

La enzima tumoral presenta una gran cantidad de diferencias con la normal. En células normales la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa es un tetrámero de subunidades idénticas de 36 kDa. La enzima purificada de Ehrlich es un heterodímero de 87 kDa, cuyas subunidades pesan 54 y 33 kDa. Sin embargo, en la línea tumoral HeLa está compuesta sólo por la subunidad de 36 kDa, aunque no se ha determinado su estado de oligomerización (Nakano *et al.*, 1992). En otras células, como el cáncer de próstata Dunning R3327, se piensa que el heterodímero es la forma funcional de la enzima (Bagui *et al.*, 1999).

Esta enzima en tumores también presenta alteraciones en las propiedades regulatorias. Es más resistente al pH ácido que la enzima normal, a pesar de que el pH óptimo es el mismo, esto es especialmente notorio a pH ácidos entre 6.4 - 7.6.

La enzima tumoral a diferencia de la normal depende en una alta proporción de NAD^+ para estabilizarse durante la purificación, indicando diferencias en el sitio de unión. La afinidad aparente por NAD^+ es dos veces menor para la enzima tumoral que para la muscular, $K_s = 0.04$ vs 0.07 mM (Bagui *et al.*, 1999).

La inhibición de esta enzima por ATP también muestra diferencias, siendo la enzima tumoral más resistente a la inhibición por este metabolito. La enzima de Ehrlich es inhibida de manera mixta ($\alpha > 1$) con respecto al NAD^+ , con una afinidad 9 veces menor que la enzima muscular ($K_i = 7.8$ mM), y con respecto al gliceraldehído 3-fosfato es no competitivo, con una K_i de 19 mM (Bagui *et al.*, 1999). Nakano *et al.* (1992) demostraron que la K_i de la enzima aislada de la línea HeLa hacia el ATP es 2.9 mM y el modo de inhibición es competitivo con respecto al NAD^+ y con respecto al gliceraldehído 3-fosfato es no competitivo. A pH bajo la diferencia en la sensibilidad de las enzimas normales y tumorales se amplía, el ATP inhibe menos a la enzima normal cuando el pH se basifica y en células tumorales ocurre al contrario (Bagui *et al.*, 1999). Suponiendo que el mecanismo de

reacción es similar al de otras aldehído (o alcohol) deshidrogenasas citosólicas, en donde el aldehído se une primero, después la coenzima, la cual se libera reducida y posteriormente se libera el ácido orgánico, se propone que el ATP se une a la enzima después de que el gliceraldehído 3-fosfato se ha pegado compitiendo con el NAD^+ por el complejo binario, aunque es posible que no una al mismo sitio que este cofactor. Debido a las dos K_i que se encontraron es posible que haya dos sitios o formas de la enzima a los que el ATP se une, y esto daría el componente no competitivo de la inhibición mixta hacia el NAD^+ .

Por otro lado, se ha propuesto que esta enzima podría competir por el fosfato con la mitocondria, dada su alta actividad, a pesar que el transporte de fosfato a la mitocondria en células tumorales parece ser normal o incluso superior, en comparación con el de células normales (Pedersen, 1978).

ALTA ACTIVIDAD DE LA LACTATO DESHIDROGENASA

La isoforma tumoral de la lactato deshidrogenasa (LDH A) es particularmente inducible por factores transcripcionales como HIF-1 y MYC, ya que al igual que los genes de otras enzimas de la glicólisis tiene una sección ChoRE en el promotor y un Elemento de Respuesta a AMPc (CRE) (Dang *et al.*, 1997, 1999). La transformación de fibroblastos normales con oncogenes como RAS y SRC también induce un incremento importante en la actividad de esta enzima, lo cual acarrea una redistribución del piruvato en condiciones aerobias, de la oxidación por el ciclo de Krebs hacia la reducción y expulsión fuera de la célula (Dang *et al.*, 1997).

La elevada actividad de la lactato deshidrogenasa en comparación con el acarreador de piruvato hace posible que el flujo del piruvato sea preferentemente hacia lactato. Además, es posible que también pueda competir con las lanzaderas de equivalentes reductores por NADH, ya que a pesar de que estas tengan una velocidad normal no es comparable a la de la lactato deshidrogenasa.

La manera en que se controla la glicólisis en las células normales en aerobiosis ocurre a través de las interacciones alostéricas de la HK, PFK-I y PK (ver adelante). La alta actividad glicolítica aerobia está estrechamente relacionada con el cambio en las isoformas de estas enzimas. Las isoformas tumorales difieren estructuralmente o en la manera en que

responden a los metabolitos, ya sea los sustratos, productos o efectores alostéricos (Eigendrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992), de tal manera que se minimiza la regulación normal y se pierde el control normal sobre la vía.

LA HEXOCINASA TUMORAL

Se ha encontrado una correlación entre el estado de desdiferenciación y la actividad específica de la hexocinasa (especialmente la unida a la membrana externa mitocondrial). La actividad de la hexocinasa (HK) se encuentra muy incrementada en células tumorales de rápido crecimiento con respecto a su tejido de origen (Knox *et al.*, 1970; Bustamante *et al.*, 1977; Pedersen, 1978; Nakashima *et al.*, 1991). Las células transformadas con virus muestran el mismo tipo de ubicación intracelular y actividad específica de la HK que las células tumorales, aunque las células hepáticas regenerantes no muestran estas características (Bustamante *et al.*, 1977). Estas observaciones llevaron a pensar a varios investigadores que esta era una característica propia de la neoplasia y no de la proliferación normal. Sin embargo, en tejidos fetales la HK también se encuentra unida a la mitocondria (Bustamante *et al.*, 1977).

Todas las enzimas de la glicólisis se encuentran en mayor concentración en las células tumorales, pero de todas ellas destaca la HK, ya que aumenta 136 veces con respecto al hígado (Nakashima *et al.*, 1985).

Se han descrito cuatro isoformas de la HK; HK I, en eritrocitos y cerebro; HK II, en tejidos sensibles a insulina como músculo, corazón, diafragma y tejido adiposo; HK III, se expresa en baja proporción en todos los tejidos; HK IV o glucocinasa, es la isoforma predominante en hígado y muestra una afinidad muy baja por glucosa a diferencia del resto de las isoformas, $K_m = 12 \text{ mM}$ vs 0.1 mM (Golshani *et al.*, 1997).

La isoforma que principalmente se expresa en las células tumorales es la HK II, aunque la HK I también se expresa (Nakashima *et al.*, 1988, 1991). La HK II también se encuentra en células que tienen una velocidad de glicólisis aerobia alta, como las de médula renal, en tejidos fetales o en células de retina (Pedersen, 1978; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992). En células tumorales se han descrito al menos 3 formas de las HK. La HK II existe en 2 formas, HK IIa y HK IIb, y también se encuentra la HK I en menor

proporción. De todas ellas la HK IIb es la forma más importante y representa un gran porcentaje de la actividad total de HK. En varios tejidos, incluyendo tumores, se ha detectado la presencia de dos mRNA de HKII que pudieran corresponder a los dos tipos de HKII (Golshani *et al.*, 1997).

En células tumorales, además del incremento en la actividad de la HK, ocurre una reubicación de la enzima (figura 4) del citosol a la membrana externa mitocondrial. En células tumorales el 40-85% de la HK se encuentra unida a la membrana externa mitocondrial (Bustamante *et al.*, 1977; Pedersen, 1978; Arora *et al.*, 1989; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Nakashima *et al.*, 1991; Baggeto, 1992), siendo 4 veces mayor la actividad específica en la mitocondria que en el citosol (Bustamante *et al.*, 1977).

En la unión está involucrado un complejo proteico constituido por una porina o VDAC (Voltaje Dependent Anionic Chanel) (Nakashima *et al.*, 1991), una molécula semejante a la insulina y la adenin nucleótido translocasa (Nakashima *et al.*, 1991). Se ha propuesto que en la forma expresada por las células tumorales el amino terminal está implicado en la unión a la membrana, el cual en células normales es probablemente eliminado durante la edición del mRNA. La HK de cerebro tiene un extremo de 12 aminoácidos hidrofóbicos que le permiten unirse a la membrana mitocondrial; en el caso de tumor este extremo está constituido de 30 aminoácidos y tal vez represente una secuencia no cortada o editada (Nakashima *et al.*, 1988; Nakashima *et al.*, 1991).

Todas las formas tumorales de la HK se pueden unir reversiblemente a la membrana externa mitocondrial (HK IIa , HK IIb y HK I). La HK IIb es la forma más abundante, particularmente en la mitocondria. Existe evidencia que apunta que la HK IIb es más hidrofóbica y menos cargada negativamente que el resto de las formas y por esto se une a la mitocondria en mayor proporción (Golshani *et al.*, 1997).

La unión de la HK a la membrana mitocondrial y su asociación con la ANT permite que la actividad de esta enzima se acople a la fosforilación oxidativa (figura 4). La HK es capaz de tomar de manera preferente ATP intramitocondrial que citosólico; el suministro de ATP mitocondrial provee del 72% del ATP que esta enzima ocupa (Arora *et al.*, 1988). La *Km* aparente de la HK por ATP es menor cuando está unida a la membrana mitocondrial (Nakashima *et al.*, 1991). La HK unida a la mitocondria es un 30% menos sensible a la inhibición por glucosa 6-fosfato que la HK soluble, la cual parece sólo ser parcialmente

sensible a la glucosa 6-fosfato; un 20% de la actividad es insensible a 0.6 mM de glucosa 6-fosfato que inhibe totalmente la actividad de esta en tejidos normales (Bustamante *et al.*, 1977; Nakashima *et al.*, 1988; Baggeto, 1992). Es posible que la unión de la HK a la mitocondria pueda limitar el acceso de la glucosa -6 fosfato al sitio inhibitorio (Pedersen, 1978). La HK está dividida en 2 secciones repetidas una es la catalítica y la función de la otra podría ser inhibitoria, la cual se encuentra en una gran cercanía con la porina (Nakashima *et al.*, 1991). Sin embargo, la HK de cerebro, que también está unida a la membrana, se inhibe en un 100% por glucosa 6-fosfato (Bustamante *et al.*, 1977). A pesar de que la HK cambia sus características al asociarse con la membrana, la enzima soluble presenta afinidades similares a la de HK II de células normales. La K_m por ATP y glucosa respectivamente de 1-1.4 mM y 0.13-0.2 mM (Nakashima *et al.*, 1988; Grivell *et al.*, 1995). Además, al igual que otras HK, la forma tumoral tiene una afinidad baja por fructosa ($K_m=6$ mM), lo cual explica por qué en estas células la fructosa no se metaboliza rápidamente (Grivell *et al.*, 1995, Rodríguez *et al.*, 2001).

Ya que la HK está unida a la membrana el ADP, producto de la catálisis de la enzima, entra rápidamente a la mitocondria efectuándose varios ciclos donde el ADP funciona como aceptor de fosfato, el cual queda atrapado en los hexosas e intermediarios glicolíticos fosforilados (Bustamante *et al.*, 1977; Arora *et al.*, 1989). Esto depleta a la célula de fosfato y provoca que la respiración se inhiba parcialmente (Koobs, 1972; Sussman *et al.*, 1980; Baggeto, 1992). Sin embargo, la limitación también está dada por la baja actividad de los sistemas de transporte y utilización del ADP y fosfato mitocondrial y un aumento en las enzimas que utilizan estos cofactores en la glicólisis (Baggeto, 1992).

En nuestro grupo hemos demostrado que el nivel de fosfato se recupera, tras una dismunición abrupta, mientras el efecto Crabtree sigue presente (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2001). Esto indica que la limitación de fosfato explica sólo parcialmente la inhibición de la fosforilación oxidativa por glucosa.

Debido al acceso preferencial de la HK al ATP mitocondrial (con respecto a otras enzimas que utilizan ATP) y que no se inhibe por cantidades altas de glucosa 6-fosfato, se promueve que la glucosa sea metabolizada rápidamente y que las pozas intracelulares de los precursores de los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos aumenten (figura 4). Una disponibilidad alta de glucosa 6-fosfato es necesaria para que las células se dividan a altas

velocidades (Arora *et al.*, 1989; Nakashima *et al.*, 1991), incluso cuando las células se encuentran poco vascularizadas (Nakashima *et al.*, 1991). Se propone que la unión de la HK a la mitocondria permite que el ciclo de Krebs incremente su flujo y acelere la síntesis de precursores (Golshani *et al.*, 1997), a pesar de la inhibición de la respiración celular, ya que se ha probado que el ciclo de Krebs al oxidar piruvato genera altas cantidades de alanina y aspartato (Kelleher *et al.*, 1987).

ACTIVIDAD INCREMENTADA DE PFK II

En tejidos normales el estado energético regula la actividad de las vías que producen ATP, como la glicólisis. Esto ocurre por la modulación en diferentes puntos de la vía por los productos de la hidrólisis del ATP y otros metabolitos (Ramaniah, 1974). Sin embargo, en algunas situaciones es necesario que esta vía sea activada aunque se encuentre un alto estado energético, como para la biosíntesis de aminoácidos o lípidos. La manera en la que la célula activa la glicólisis en estas circunstancias es a través de la producción de la fructosa 2,6-bifosfato, el activador más potente de la PFK I, capaz de activar a esta enzima aún en presencia de ATP saturante (Hue *et al.*, 1993, 1987). La concentración de fructosa 2,6-bifosfato se encuentra incrementada en las células tumorales, en células normales proliferativas y en células transformadas con virus o con ésteres de forbol; la concentración va de 2 hasta 10 veces más alto que en tejidos normales (20-100 vs 6-10 μM) (Hue *et al.*, 1987).

La concentración en estado estacionario de fructosa 2,6-bifosfato en células normales está en función de la actividad de la enzima que lo sintetiza, la fosfofructocinasa II (PFK II), y la enzima que lo hidroliza, la fructosa 2,6-bifosfatasa (F26BPasa). Estas dos enzimas se encuentran en un sólo péptido de 55 kDa que muestra dos sitios catalíticos, correspondientes a la cinasa y fosfatasa. El estado de oligomerización es como dímero. Las dos actividades catalíticas son controladas alostéricamente: el citrato y glicerol 3-fosfato inactivan a la cinasa y activan a la fosfatasa (Hue *et al.*, 1987, 1993). En la línea tumoral ascítica de Ehrlich se ha mostrado que la PFK II ha perdido la actividad de 2-fosfatasa, de tal manera que sólo puede realizar la síntesis de fructosa 2,6-bifosfato. Al aislar el gen tumoral de esta enzima y expresarlo en *E. coli* se ha determinado que la actividad de

fosfatasa se recupera, sugiriendo que la pérdida de la actividad de la enzima es debida a la modificación postraducciona del producto (Hue *et al.*, 1993).

LA PIRUVATO CINASA TUMORAL

La piruvato cinasa (PK) existe en 3 formas codificadas en dos loci; M1 y M2 en un gen, y L en otro. De todas estas isoformas sólo la forma M1, que pertenece al músculo, no se comporta de manera cooperativa hacia el fosfoenolpiruvato. En una gran cantidad de tejidos neoplásicos se ha determinado que la isoforma M2 es la predominante (Eigenbrodt *et al.*, 1985), y su actividad se encuentra aumentada 10 veces con respecto a células normales (Nakashima *et al.*, 1988). Se ha propuesto que esta enzima podría compartir características regulatorias con la enzima hepática: una afinidad aparente menor por fosfoenolpiruvato, inhibición por alanina, activación por fructosa 1,6-bisfosfato y podría ser modulada covalentemente a través de la fosforilación por una protein cinasa dependiente de AMP_c (Eigenbrodt *et al.*, 1985).

A partir de la observación de que la PK tiene una afinidad aparente por fosfoenolpiruvato muy baja y que es inhibida por concentraciones fisiológicas de alanina y ATP, se propuso que esta enzima podría ser un punto importante de control, que produciría que los intermediarios de la glicólisis como el glicerol 3-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato y la fructosa 1,6-bisfosfato incrementen su concentración de tal forma que se promueve la canalización de estos intermediarios fosforilados hacia la síntesis de serina, fosfolípidos, triglicéridos, esfingomiéline, y nucleótidos de purina y pirimidina. El control de la PK sería relevado a otra enzima cuando la concentración de fructosa 1,6-bisfosfato aumenta el orden micromolar o cuando el fosforibosil pirofosfato o serina aumentan en el orden milimolar, reactivando a la PK, e inhibiendo su fosforilación. Además, la fructosa 1,6-bisfosfato también podría activar a la PFK I, incrementando el flujo hacia lactato (Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992).

Sin embargo, la cinética de esta enzima al variar el fosfoenolpiruvato es hiperbólica; no mostrando cooperatividad (Gumisnka *et al.*, 1996), lo cual descarta a la piruvato cinasa como sitio regulatorio. La fosforilación dependiente de AMP_c tampoco podría ser un mecanismo de regulación, ya que la única isoforma de la piruvato cinasa que

responde a este tipo de regulación es la L, no la M2 (Eigenbrodt *et al.*, 1985; Guminska *et al.*, 1996).

La PK tumoral al tener una actividad tan alta puede competir contra el translocador de adenin nucleótidos por ADP, cuya actividad se encuentra muy reducida (Pedersen, 1978; Woldegiorgis *et al.*, 1985). Esta competencia podría inhibir la respiración en presencia de glucosa, lo cual provocaría que la fosforilación oxidativa disminuyera el control negativo que ejerce sobre la glicólisis y permitiría que esta operara en presencia de oxígeno.

Como se puede apreciar, las teorías presentadas hasta el momento para explicar la pérdida del efecto Pasteur no han tomado en cuenta los procesos subyacentes de la inhibición de la glicólisis por el oxígeno, es decir: el por qué no disminuye la incorporación de carbohidratos a la vía y por qué la velocidad de la glicólisis no cambia por la exposición a oxígeno.

LA PFK I COMO POSIBLE SITIO DE LA PÉRDIDA DEL EFECTO PASTEUR

LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y CINÉTICAS DE LA PFK I

Antes de seguir con la discusión acerca del mecanismo de la pérdida del efecto Pasteur y su relación con la PFK I es necesario mencionar algunas características importantes de la enzima.

La fosfofructocinasa I (PFK I) cataliza la transferencia del fosfato y del ATP hacia el hidroxilo del carbono 1 de la β -D-fructosa 6-fosfato. Esta es una reacción sumamente exergónica ($\Delta G = -25$ kJ/mol), y los productos de la reacción son ADP y fructosa 1,6-bisfosfato. En esta reacción la histidina catalítica arranca el protón del hidroxilo del carbono 1 de la fructosa 6-fosfato. El electrón desapareado del carbono 1 es capaz de atacar nucleofílicamente al fósforo y del ATP, cuyas cargas negativas son apantalladas por el ion Mg^{++} .

El mecanismo cinético de reacción de la PFK-I de la mayoría de los organismos es al azar, el cual es común para las cinasas. Sin embargo, la PFK I hepática tiene un

mecarismo de reacción ordenado, en donde la fructosa 6-fosfato es el primer sustrato que se une (Uyeda, 1992).

La PFK I de mamíferos es un tetrámero, el peso de cada subunidad es de $85,000 \pm 5,000$ kDa. Está codificada por 3 genes distintos que reciben su nombre del tejido donde se encuentran preferencialmente: Hígado (L), Plaqueta o Cerebro (C, H o P) y Músculo (M) (Dunaway *et al.*, 1985). La movilidad electroforética aumenta en el siguiente orden L, P y M; y cada subunidad aparentemente tiene asociadas diferentes capacidades regulatorias (Dunaway *et al.*, 1985). Las subunidades pueden asociarse azarosamente formando híbridos de las 3 subunidades, cada híbrido es una isoforma, de tal manera que hay 3^4 combinaciones posible o isoformas (Oskam *et al.*, 1985; Vora *et al.*, 1985).

La PFK I es una enzima alostérica que muestra cooperatividad positiva por la fructosa 6-fosfato y se comporta de manera hiperbólica con respecto al ATP (ver Apéndice 1 y Metodología para mayor detalle). La mayoría de los efectores de esta enzima disminuyen o aumentan la afinidad aparente por la fructosa 6-fosfato (Uyeda *et al.*, 1972, Mansour *et al.*, 1977). El modelo de Monod describe muy bien el alosterismo de esta enzima (Blangy *et al.*, 1968; Kemp *et al.*, 1983). En este modelo hay dos formas de la enzima una llamada tensa o T y otra relajada o R, sólo la forma R es activa. Los efectores desplazan el equilibrio de las formas. Los activadores hacia la forma R y los inhibidores hacia la T (Uyeda *et al.*, 1972). La fase de retardo (lag) en la cinética de la PFK-I con respecto a la fructosa 6-fosfato en bajas concentraciones ocurre porque una buena parte de la población de la enzima está en forma inactiva, la activación ocurre al aumentar la población de enzima activa.

La cristalografía de rayos X ha mostrado que el asa 6 de la PFK I se mueve en la transición alostérica, de tal forma que las argininas que en la forma R unen al fosfato de la fructosa 6-fosfato ahora se asocian con un glutámico, impidiendo la unión de la fructosa fosforilada (Evans *et al.*, 1990).

LA PFK I Y EL EFECTO PASTEUR

Diferentes investigaciones han abordado el papel de la PFK-I en el efecto Pasteur. El análisis de entrecruzamiento nos indica que la PFK I es la enzima que se activa o inactiva en la transición aeróbica-anaeróbica de la glicólisis (Lagunas *et al.*, 1985; Tewjani,

1978). Durante la aerobiosis los niveles de ATP y citrato incrementan su concentración debido a que la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs se encuentran activos. El incremento en la concentración de estos metabolitos inhibe a la PFK I ya que estos son los inhibidores más potentes de la enzima (Ramainah, 1972; Tewjani, 1978). Al inhibirse esta enzima y siendo una de las que en mayor porcentaje regulan el flujo glicolítico (Rapoport *et al.*, 1976; Puigjaner *et al.*, 1997; Jannaschk *et al.*, 1999; Jucker *et al.*, 1999) entonces la velocidad de la vía desciende. En anaerobiosis la concentración de estos dos metabolitos desciende y la del ADP, fosfato y AMP aumentan (Ramainah, 1972; Uyeda *et al.*, 1972; Tewjani, 1978); como estos son activadores de esta enzima y el flujo glicolítico aumenta paralelamente.

En general en las células en donde la glicólisis juega el papel más importante en la producción de energía hay una tendencia hacia la desaparición del efecto Pasteur. Esto se ilustra muy claramente en el caso de las células tumorales en donde cada grado de desdiferenciación es acompañado por el aumento en la velocidad glicolítica y por la pérdida gradual del efecto Pasteur (Pedersen, 1978). Aunque en algunos casos la desaparición de este fenómeno obedece a la función que la célula cumple dentro del organismo (Ramanaiah, 1974), no obstante la pérdida del efecto Pasteur está asociada al metabolismo de una célula proliferativa. La ocurrencia de este fenómeno se debe a la pérdida de la susceptibilidad de la PFK I por sus efectores normales o a las altas concentraciones que estos pueden alcanzar en un determinado linaje celular, es decir y como Boscá (1981) bien se ha percatado, la PFK I en las células que no presentan efecto Pasteur se encuentra laxamente regulada.

LA PÉRDIDA DEL EFECTO PASTEUR EN TUMORES Y LA PFK I

Conforme la célula tumoral se desdiferencia y se divide más rápidamente, va adquiriendo una mayor actividad específica de la fosfofructocinasa (Staal *et al.*, 1985; Oskam *et al.*, 1985; Nakashima *et al.*, 1988; Kole *et al.*, 1991; Sánchez-Martínez *et al.*, 1997;), de manera que los tumores de rápido crecimiento presentan una actividad muy incrementada de esta enzima (hasta 17 veces). Este incremento marca la pauta para la desregulación de la glicólisis en este punto, ya que al adquirir una actividad mayor a pesar

de que la inhibición porcentual de esta enzima sea la misma, la actividad es mucho mayor en cualquier situación. Correlacionado con el aumento de la actividad de esta enzima está el aumento en los productos de la reacción, especialmente la fructosa 1,6-bifosfato, que puede activar a esta enzima y provocar que la regulación alostérica negativa se minimice.

A diferencia de lo sugerido por Eigenbrodt *et al.* (1985), se han encontrado cambios en la composición isomórfica de la PFK I asociados a la progresión del cáncer. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la HK y PK; en donde las enzimas de hígado maduro son reemplazadas por enzimas fetales (que presentan una regulación negativa laxa), la isoforma de la PFK I de hígado aparece ampliamente distribuida en los cánceres, aunque también se han encontrado aumentos importantes en la subunidad de plaqueta, mientras que la subunidad muscular se encuentra ausente (Boscá *et al.*, 1982; Dunaway *et al.*, 1985; Staal *et al.*, 1985; Oskam *et al.*, 1985; Sánchez-Martínez *et al.*, 1997, 2000). En particular la PFK I de células ascíticas está compuestas por L, M y C en la siguiente proporción 32:18:50 encontrándose una forma M alterada (Sánchez-Martínez *et al.*, 2000). Estas células al igual que los fibroblastos, mucosa intestinal, vaso y testículos tienen una alta proporción de forma C, y aunque es usual en tumores, en general esta forma no es la predominante, sino la hepática. El mecanismo involucrado en la expresión incrementada del protómero hepático puede deberse a que esta última isoforma posee un ChoRE (ver figura 2A), que puede ser activado por HIF-1.

Como ya se mencionó cada isoforma tiene asociadas propiedades regulatorias diferentes, lo cual ha llevado a pensar que el simple cambio en la isoforma y en la cantidad de enzima provocan que la regulación normal de la vía y el efecto Pasteur se pierdan (Pedersen, 1978; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992). Sin embargo, las propiedades cinéticas de todas las isoformas de la PFK I permitirían tener un efecto Pasteur apreciable (Eigenbrodt *et al.*, 1985; Dunaway *et al.*, 1985), sugiriendo que la alteración en la actividad de esta enzima alcanza otros niveles capaces de modificar significativamente las propiedades regulatorias de las enzimas.

Estudios de varios laboratorios han mostrado que la fosfofructocinasa I tiene propiedades cinéticas diferentes a las de otras células de mamífero. Particularmente en los sitios alostéricos, las K_s para ambos sustratos ($K_{sATP} = 23 \mu M$, $K_{sfruc\ 6P} = 53-120 \mu M$) es muy similar a la de las enzimas normales (Meldolesi *et al.*, 1976). La actividad de la

enzima tumoral es más sensible a los activadores alostéricos como la fructosa 2,6-bifosfato, ADP o AMP (Wu *et al.*, 1966; Meldolesi *et al.*, 1976; Boscá *et al.*, 1982; Staal *et al.*, 1985; Oskam *et al.*, 1985; Kole *et al.*, 1991; Sánchez-Martínez *et al.*, 1997, 2000) y es menos sensible a los inhibidores alostéricos como el citrato o el ATP (Boscá *et al.*, 1982; Vora *et al.*, 1985; Staal *et al.*, 1985; Oskam *et al.*, 1985; Kole *et al.*, 1991). Este patrón de aumento en la sensibilidad hacia los activadores y disminución en la sensibilidad por los inhibidores no es universal para los ligandos de la enzima tumoral. Se han encontrado diferencias en la afinidad del sitio alostérico de la fructosa 1,6-bifosfato, el cual a pesar de ser producto es un efector alostérico de la enzima hepática. La enzima tumoral en condiciones cercanas a las fisiológicas es insensible a la activación por fructosa 1,6-bifosfato. La ausencia de la activación por fructosa 1,6-bifosfato y la activación por fructosa 2,6-bifosfato indica que los sitios de unión son independientes para cada bifosfato, lo que contradice la propuesta de que estos dos intermediarios comparten un sólo sitio de unión (Wu, 1966; Boscá *et al.*, 1982; Sánchez *et al.*, 1997, 2000). Sin embargo, la activación de esta enzima por fructosa 1,6-bifosfato ocurre en condiciones de pH ácido (< 6.8) o a concentraciones altas de ATP (Boscá *et al.*, 1982). El segundo caso sugiere que el sitio de unión de las hexosas bifosfatadas se encuentra modificado, de tal manera que sólo se puede apreciar activación por fructosa 1,6-bifosfato cuando un aminoácido esencial en la unión se protona.

Se ha determinado que la enzima tumoral es más sensible a la inhibición por fosfoenolpiruvato que las enzimas normales (Wu, 1966; Boscá *et al.*, 1982; Sánchez-Martínez *et al.*, 1997, 2000). Esta capacidad contrasta con la pérdida de la afinidad hacia el citrato, ya que estos dos efectores comparten el mismo sitio dentro de la enzima.

El perfil de la actividad de la enzima al variar el pH en tumores tiroideos de mediano crecimiento no difiere mucho del de tejido normal (Meldolesi, 1976). Sin embargo, los experimentos de Oskam *et al.* (1985) y de Staal *et al.* (1985) indican en que la actividad máxima de la enzima en tumores de rápido crecimiento y metastáticos no varía entre pH 7.35 y 8.0, en donde ocurre una activación importante de la enzima normal ($pK_a = 7.1-7.3$), indicando que el pK_{es1} es más bajo que el normal. Esta diferencia en la sensibilidad al pH podría interpretarse como una adaptación al medio poco vascularizado.

Las bases estructurales de las alteraciones en la regulación de esta enzima no son claras, aunque se han propuesto algunos mecanismos para explicarlas. La identidad del

cDNA de la isoforma C aislada de células ascíticas de Ehrlich con el gen original de esta isoforma es alta, indicando que la mutación generalizada de esta enzima no juega un papel en este fenómeno. Sin embargo, las secuencias putativas que forman el sitio alostérico del ATP (His 764, 766, 769) no se encuentran conservadas, y se han encontrado aminoácidos que podrían cumplir la función de unir a este ligando (His 780 y 781) con lo cual se puede explicar la diferencia en la afinidad del sitio alostérico del ATP (Sánchez-Martínez *et al.*, 2000). La predicción del peso de la forma tumoral a partir del cDNA difiere en 2 kDa de la forma encontrada, lo que sugiere que fenómenos de modificación postraduccional ocurren y brindan a la enzima propiedades nuevas (Sánchez-Martínez *et al.*, 2000).

En gliomas humanos se ha determinado una actividad de proteína cinasa independiente de AMPc que puede fosforilar a la subunidad hepática. La regulación por fosforilación de la PFK I no es clara. Sin embargo, se ha argumentado que la fosforilación dependiente de AMPc inactiva a la enzima hepática o muscular, y la fosforilación dependiente de Ca^{++} activa a la isoforma C (Staal *et al.*, 1985). En células tumorales se ha mostrado que sólo existe fosforilación dependiente de Ca^{++} . El análisis de la secuencia del cDNA indica que en la forma tumoral se han perdido secuencias de fosforilación para la proteína cinasa dependiente de AMPc, tanto en el carboxilo como en el amino terminal. Sin embargo, se han encontrado secuencias de fosforilación para la proteína cinasa C, que al parecer son inactivos, aunque no se ha determinado si lo son para las cinasas tumorales (Sánchez-Martínez *et al.*, 2000).

Los estudios realizados han carecido de un enfoque cuantitativo, de manera que se limitan a describir la concentración inhibitoria o activadora que alcanza un 50% de la actividad (IC50 o AC50), y que llaman erróneamente K_a o K_i . Para esta enzima este enfoque es particularmente poco informativo, ya que la AC50 o IC50 dependen en última instancia de la relación de enzima inactiva (T)/ enzima activa (R), es decir L , la cual es modificada por el pH, la fuerza iónica, la propia concentración de sustratos o efectores y por la concentración de enzima. De tal forma que la comparación de las isoformas tumorales y normales al reportar sólo la IC50 o AC50 para una condición única no tiene significado práctico. Ya que la PFK-I en células normales controla el efecto Pasteur propongo que la actividad de esta enzima en células tumorales se encuentra alterada en cantidad o en calidad, por lo que se pierde el patrón normal de regulación de esta enzima.

HIPÓTESIS

La fosfofructocinasa I tumoral tiene características cinéticas que provocan la pérdida parcial de la regulación normal, provocando la pérdida del efecto Pasteur.

OBJETIVOS

General

Determinar las características cinéticas de la fosfofructocinasa I y la concentración de sus ligandos en una línea tumoral de rápido crecimiento para predecir su comportamiento *in situ*.

Particulares

1. Cuantificar el grado del efecto Pasteur en la línea tumoral de trabajo.
2. Determinar la concentración intracelular de los ligandos de la fosfofructocinasa I implicados en el efecto Pasteur.
3. Determinar la velocidad máxima y las constantes de disociación de los efectores y de los substratos de la fosfofructocinasa I, así como su sensibilidad al pH.

METODOLOGÍA

CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA TUMORAL DE TRABAJO

La línea tumoral que se utilizó como modelo experimental en este trabajo fue la línea ascítica AS-30D. El origen de esta línea es el hígado de rata transformado. Se obtuvo al administrar 3'-metil-4-dimetilaminoazobenceno (0.06% w/w) por vía oral durante 12 semanas. Posteriormente se aislaron los nódulos hepáticos cancerosos y se transplantaron a los pulmones de ratas sanas, en donde se realizó la selección de los tumores ascíticos (Smith *et al.*, 1970).

Según la clasificación de Pedersen (1978), esta línea pertenece a las células tumorales de rápido crecimiento. Su tiempo medio generacional *in vitro* es de 29 horas (página electrónica ATCC, ver Bibliografía) y presenta algunas características metabólicas representativas de las células de este tipo, como son: 1) alta velocidad glicolítica aerobia (Greenhouse *et al.*, 1976; Pedersen, 1978; Nakashima *et al.*, 1984), 2) síntesis incrementada de lípidos y colesterol (Briscoe *et al.*, 1994), 3) velocidad de consumo de glutamato y glutamina altas (Kelleher *et al.*, 1987), siendo precisamente estos aminoácidos los que suministran de sustratos a la fosforilación oxidativa (Nakashima *et al.*, 1984; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000) y de esqueletos carbonados a las vías anapleróticas mitocondriales (Briscoe *et al.*, 1994; Kelleher *et al.*, 1987). Esta línea también presenta una velocidad cetolítica alta, especialmente teniendo como sustrato acetoacetato (Briscoe *et al.*, 1994).

Se ha sugerido que AS-30D tiene un ciclo de Krebs truncado, como el de los hepatomas de Morris. La velocidad de síntesis de lípidos a partir de acetoacetato y piruvato es muy alta, es decir, el citrato formado intramitocondrialmente es expulsado de la mitocondria e incorporado a altas velocidades hacia la síntesis de lípidos, indicando que el ciclo de Krebs en las células AS-30D se encuentra al menos parcialmente truncado (Briscoe *et al.*, 1994). Aunque, a diferencia de los hepatomas de Morris (Parlo *et al.*, 1984), no se encuentra totalmente truncado.

Sin embargo, las mitocondrias de esta línea son capaces de oxidar eficientemente piruvato y citrato (Dietzen *et al.*, 1983), lo cual no corresponde con la propuesta del ciclo truncado. No obstante, es difícil extrapolar los resultados encontrados en mitocondrias *in*

vitro a la condición *in situ*, ya que al evaluar el destino del piruvato y citrato en mitocondrias aisladas se eliminan los procesos extramitocondriales que consumen citrato (lipogénesis y colesterogénesis), por lo que las conclusiones del trabajo citado pueden estar incompletas o ser erróneas. Sin embargo, varias observaciones indican que el ciclo no se encuentra totalmente truncado *in situ*: 1) los esqueletos carbonados de la glutamina no se incorporan en su totalidad al citrato citosólico, y de hecho promueven su oxidación (Kelleher *et al.*, 1987); 2) la velocidad de producción de CO₂ del carbono uno del piruvato es alta, lo cual sugiere que la PDH puede oxidar eficientemente al piruvato (Dietzen *et al.*, 1993), a diferencia de lo que sugiere la propuesta original de que la oxidación del piruvato debería estar muy disminuida; 3) las enzimas mitocondriales que oxidan citrato no están disminuidas o inactivadas, sino que se encuentran sobreexpresadas (Dietzen *et al.*, 1993).

En su conjunto, los datos sugieren que el ciclo de Krebs de esta línea no se encuentra totalmente truncado, aunque una fracción importante del citrato mitocondrial puede participar en la síntesis de lípidos.

Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos estudiado el efecto Crabtree en esta línea. AS-30D presenta un efecto Crabtree de magnitud considerable: 60% de inhibición de la respiración celular, inducido por la adición de glucosa o fructosa. Es causado, al menos en parte, por la disminución en el fosfato inorgánico y pH que provoca el catabolismo de la glucosa o fructosa. Es importante señalar que en este trabajo se demostró que la inhibición de la respiración celular ocurre en diferentes niveles, siendo el sistema fosforilante mitocondrial el blanco principal (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2001).

En un trabajo anterior de este laboratorio (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000) se determinó que esta línea presenta una alta velocidad de fosforilación oxidativa, que es mucho mayor que la velocidad de glicólisis. También se mostró que la fosforilación oxidativa suministra el requerimiento celular por ATP en más del 95%.

Es importante señalar que esta línea ha demostrado en otros laboratorios tener una actividad glicolítica y de fosforilación oxidativa comparable (Nakashima, 1984; Greenhouse, 1976), al igual que otras células tumorales de rápido crecimiento (Schmidt, 1991; Eigenbrodt, 1985), en donde el 50% del requerimiento celular por ATP es cubierto por la glicólisis, el 40% por la glutaminólisis y el 10% restante por la oxidación de ácidos grasos, piruvato o cuerpos cetónicos. Existe la posibilidad de que en este laboratorio se

cuenta con una cepa no descrita de la línea AS-30D que difiera en lo ya señalado con la (o las) cepa(s) de otros laboratorios, lo cual es muy común. Se tienen identificadas varias cepas de Ehrlich (Nu, MDA, Paris, Londres, etc.) que son prácticamente indistinguibles, pero que presentan un metabolismo particular (Greenhouse *et al.*, 1976).

La característica de que esta línea (o cepa) presente una actividad de fosforilación oxidativa tan alta, que es incluso superior comparada con la de hepatocitos (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000) puede ser tomado como una ventaja metodológica, ya que el hecho de que una línea tumoral de rápido crecimiento no presente deficiencias en la respiración y tampoco presente efecto Pasteur indica que la pérdida de la regulación normal de la glicólisis se debe a las características de las enzimas glicolíticas tumorales, descartándose inmediatamente las hipótesis de que debido a la ineficiencia del metabolismo mitocondrial ocurre la pérdida de efecto Pasteur.

MANIPULACIÓN DE LA LÍNEA TUMORAL DE TRABAJO

ASLAMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LA LÍNEA TUMORAL DE RÁPIDO CRECIMIENTO

Esta línea fue propagada por inoculación de $2 - 4 \times 10^8$ células, suspendidas en 2 ml de líquido de ascitis (filtrado de la sangre que presenta algunos componentes celulares y proteicos propios de esta), en la cavidad intraperitoneal de ratas hembras Wistar de 250 gr de peso. Las ratas inoculadas fueron alimentadas *ad libitum* de 8 a 11 días. Posteriormente se les practicó dislocación cervical y se extrajo el líquido de ascitis de su cavidad peritoneal (Smith *et al.*, 1970; Parry *et al.*, 1983; López-Gómez *et al.*, 1993).

Una vez extraído, se siguió el método de lavado y centrifugación de las células ascíticas reportado por Parry *et al.* (1983) con algunas modificaciones de este laboratorio (López-Gómez *et al.*, 1993). El líquido de ascitis fue centrifugado a 1800 rpm por 2 minutos a 4 ° C (la duración de la centrifugación y la temperatura no se variaron en las diversas centrifugaciones). El sedimento, que contenía células tumorales y componentes celulares sanguíneos, fue resuspendido en 4 a 5 volúmenes de medio Krebs-Ringer modificado (NaCl, 125 mM; KCl, 5mM; MgCl₂, 1 mM; CaCl₂, 1.4 mM; KH₂PO₄, 1 mM;

HEPES, 25 mM; pH 7.4) y centrifugado a 1500 rpm. Este procedimiento se repitió 2 veces más, con centrifugaciones a 1300 rpm. En el penúltimo lavado se adicionó albúmina sérica de bovino al 2.5 % para eliminar células muertas y componentes celulares sanguíneos contaminantes.

CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD, VIABILIDAD CELULAR Y LA CONTAMINACIÓN POR ERITROCITOS

La concentración, viabilidad y contaminación por eritrocitos de las células en suspensión fue determinada por conteo celular con hematocitómetro o cámara de Neubauer. Para determinar el porcentaje de células muertas se tiñó una alícuota de la suspensión celular con azul Tripiano al 0.05%. Las células teñidas se consideraron como células muertas (Molina, 1996). En general la viabilidad de las células aisladas fue mayor al 98% y la contaminación por eritrocitos no excedió el 0.5%.

CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DEL EFECTO PASTEUR

El grado del efecto Pasteur presente en la línea tumoral de trabajo fue determinado mediante 2 métodos cuantitativos: el Porcentaje Relativo de Efecto Pasteur y el Coeficiente de Meyerhof.

Como el efecto Pasteur se define como la inhibición de la glicólisis en presencia de oxígeno, se requiere determinar la velocidad de la glicólisis (producción de ácido láctico) en aerobiosis y anaerobiosis. Para el coeficiente de Meyerhof se determina también la velocidad de la fosforilación oxidativa (Ramainah, 1974).

El Coeficiente de Meyerhof

Este cociente indica de una manera muy somera la presencia de efecto Pasteur. Se considera que existe una relación proporcional entre el efecto Pasteur y este cociente, es decir, entre mayor efecto Pasteur sea registrado más grande será este número, considerándose que existe efecto Pasteur cuando este coeficiente es mayor a 0.33. El límite

0.33 indica que la velocidad glicolítica aerobia y anaerobia son iguales (véase fórmula) y que no hay efecto Pasteur, a pesar de que la cantidad de lactato generado sea mayor para la condición anaerobia. En anaerobiosis el piruvato sólo tiene salida como lactato, mientras que en aerobiosis una fracción es consumida por la mitocondria. Como al oxidar totalmente al lactato se necesitan 3 moléculas de oxígeno, el decremento en la producción de láctico debido a la aerobiosis será en este caso 1/3 del consumo de oxígeno -0.33- (Ramaniah, 1972).

$$CM = \frac{\text{velocidad glicolítica anaerobia} - \text{velocidad glicolítica aerobia}}{\text{velocidad de consumo de oxígeno}}$$

El Porcentaje Relativo de Efecto Pasteur

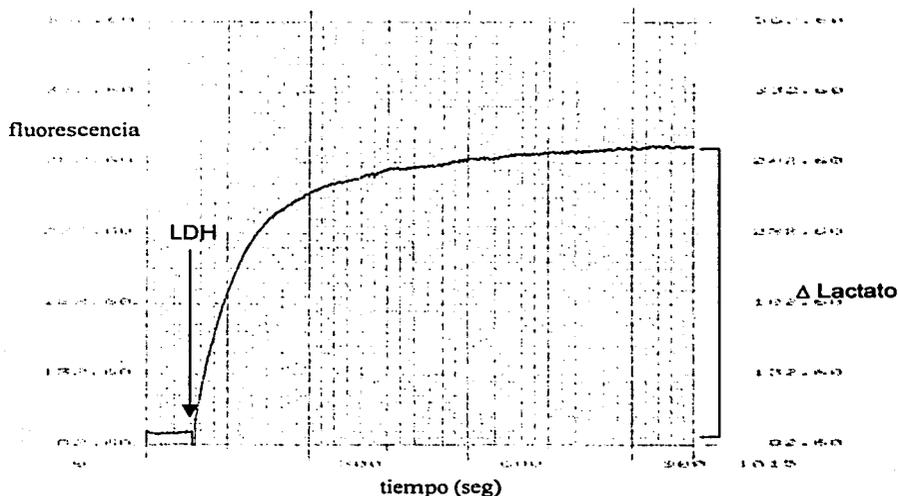
Este índice nos indica de manera porcentual la diferencia en la velocidad glicolítica aerobia y anaerobia. Tiene la ventaja de no estar relacionado con la velocidad de respiración celular, y sólo refleja el cambio en la velocidad de la glicólisis, por lo que es más confiable. De hecho, se ha determinado que este índice es mejor que el anterior, ya que el anterior puede indicar que hay efecto Pasteur a pesar de que la velocidad de glicólisis aerobia y anaerobia sean iguales. Cualquier cociente mayor que cero indica la presencia de efecto Pasteur (Ramaniah, 1972).

$$PREP = \frac{\text{velocidad glicolítica anaerobia} - \text{velocidad glicolítica aerobia}}{\text{velocidad glicolítica aerobia}}$$

DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD GLICOLÍTICA

La velocidad de la glicólisis fue determinada al cuantificar la velocidad de producción de ácido láctico, ya que en las células tumorales es el destino primordial del piruvato glicolítico (Pedersen, 1978; Baggeto, 1992; Bustamente *et al.*, 1977). El ácido láctico fue determinado en extractos celulares desproteinados y neutralizados (ver más adelante). La determinación del contenido de ácido láctico en los extractos celulares

neutralizados se realizó de acuerdo al método enzimático de Bergmeyer (1974), mediante la reacción reversa de la lactato deshidrogenasa, acoplado a la producción de NADH en el medio glicina 0.5 M – hidracina 0.4 M; pH 9.0. La hidracina reacciona con los α -cetoácidos, como el piruvato, y forma el complejo hidrazona –cetoácido, lo cual desvía el equilibrio de la reacción catalizada por la LDH hacia la formación de piruvato, con la concomitante producción de NADH. El NADH generado a partir del L-lactato se midió en un espectrofluorómetro, con las longitudes de onda de excitación y emisión de 340 y 460 nm, respectivamente. La señal de fluorescencia se calibró con una solución de NADH previamente estandarizada en un espectrofotómetro, midiendo su absorbancia a 340 nm en una cubeta de cuarzo a 25 °C.



Trazo 1. Trazo representativo de la determinación de lactato de un extracto celular.

DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La actividad de la fosforilación oxidativa fue medida en términos de consumo de oxígeno sensible a oligomicina en estado estacionario. Este se determinó polarográficamente en una cámara oximétrica, con un electrodo de O₂ de tipo Clark. Las condiciones en las que se determinó el consumo de oxígeno fueron las mismas ensayadas en la incubaciones: sin sustrato, con glucosa y se determinó la concentración de los inhibidores de la fosforilación oxidativa que abatiesen un 95 % la respiración celular (IC95). La velocidad de respiración celular en ausencia de glucosa fue de 70.2 ± 11 ng A O/ min 1×10^7 cels. Los inhibidores probados y sus respectivas IC95 fueron: KCN, 5 ± 0.2 mM; antimicina, 55 ± 17 pmol/ 1×10^7 cels; oligomicina, 337 ± 26 pmol/ 1×10^7 cels y rotenona, $550 \pm$ pmol/ 1×10^7 cels. El consumo de oxígeno insensible a oligomicina (no asociado a la síntesis de ATP por la mitocondria) fue $4 \pm 2\%$ de la respiración total.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE LOS EFECTORES DE LA FOSFOFRUCTOCINASA I

INCUBACIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES AS-30D

Después que las células fueron lavadas se incubaron a 37°C en el medio Krebs - Ringer modificado, en concentración de 2×10^8 células/ ml, en agitación orbital ligera y continua (100 rpm) en tres condiciones: sin sustrato exógeno en presencia de oxígeno, en glicólisis aerobia (con glucosa 5 mM) y en glicólisis anaerobia (con 5 mM de glucosa y burbujeo continuo con N₂ o en una condición equiparable glucosa 5 mM y con una concentración - IC95 - saturante de los inhibidores de la fosforilación oxidativa probados).

Se tomó una alícuota de 2 ml antes de iniciar el experimento y después de haber transcurrido 3, 5, 10 y 15 minutos.

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

A las alícuotas de las incubaciones se le agregó la mezcla de ácido perclórico (HClO_4) al 3% - EDTA (10mM). La fracción proteica y membranal fue eliminada por centrifugación. El sobrenadante se neutralizó con una mezcla de KOH (10 N) - TRIS (0.1 M). El KClO_4 precipitado se eliminó por centrifugación y el sobrenadante neutralizado fue dividido en varias alícuotas y almacenado a -70°C .

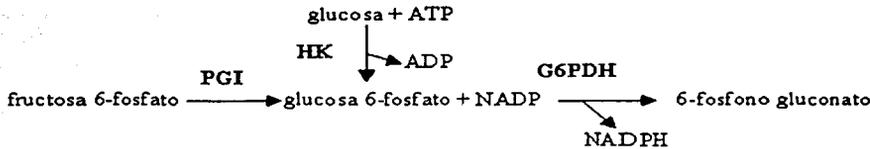
En el caso del fosfato inorgánico las muestras fueron filtradas a través de una capa de bromododecano para eliminar el fosfato contaminante extracelular, y precipitadas en ácido perclórico, según la técnica de filtración por centrifugación (Paradies *et al.*, 1983; Sussman *et al.*, 1980).

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE LOS LIGANDOS DE LA FOSFOFRUCTOCINASA

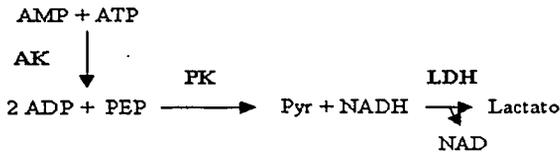
Una vez obtenida la muestra se procedió a determinar la concentración de los ligandos más importantes para la fosfofructocinasa I, o que se consideren que estén implicados en el efecto Pasteur: fructosa 6-fosfato, fructosa 1,6-bifosfato, ATP, ADP, AMP, fosfato inorgánico y citrato (el pH se determinó mediante un indicador fluorescente, ver adelante). La determinación de estos se realizó mediante técnicas enzimáticas (Bergmeyer, 1974) a excepción del fosfato en donde se utilizó una técnica colorimétrica (Sumner, 1964).

Para motivos de comparación con los valores reportados en la literatura, se considero que 1×10^7 células corresponden a 1.3 ± 0.12 mg de proteína ($n=7$) y a 12.6 ± 1.3 mg de peso húmedo ($n= 3$). Estos valores son similares a los encontrados en esta y otras líneas tumorales (Greenhouse *et al.*, 1976; Nakashima *et al.*, 1985).

El ATP se midió al cuantificar la aparición de NADPH mediante la hexocinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. La fructosa 6-fosfato fue determinada mediante el mismo ensayo más la adición de fosfoglucosa isomerasa. El medio de reacción fue el siguiente: trietanolamina (TEA), 100 mM; MgCl_2 , 5mM; glucosa, 50 mM (sólo para el ATP); pH 7.6.



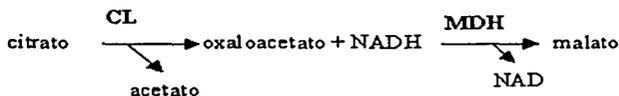
El ADP fue determinado mediante la desaparición de NADH a través de la piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa. El piruvato producido por la piruvato cinasa es tomado por la lactato deshidrogenasa y reducido a lactato. El AMP fue convertido en ADP y acoplado a la misma reacción por la miocinasa o adenilato cinasa. El medio de reacción es: fosfoenolpiruvato (PEP) 1 mM, MgSO₄ 33.4 mM, KCl 120 mM, Trietanolamina (TEA) 100 mM; pH 7.6.



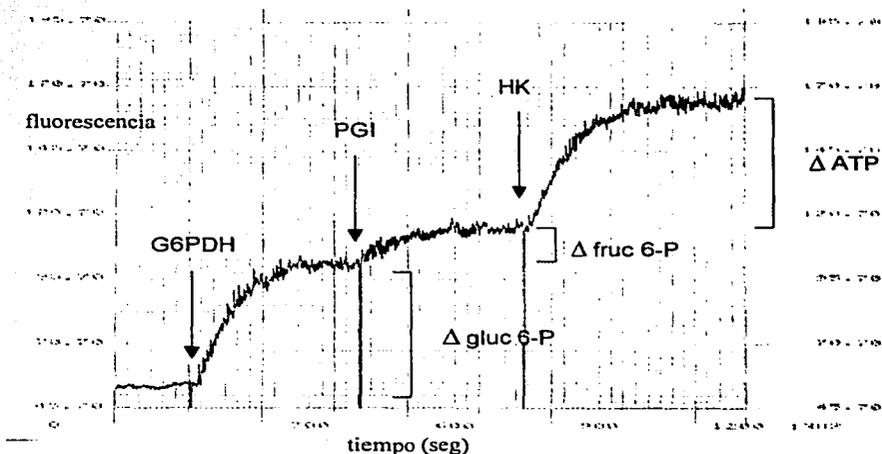
La fructosa 1,6-bisfosfato se determinó mediante el rompimiento aldólico por la aldolasa y la conversión del gliceraldehído 3-fosfato por la triosa fosfato isomerasa en dihidroxiacetona fosfato, esta es reducida por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa con la concomitante oxidación del NADH. El medio de reacción contenía TEA 100 mM; pH 7.6.



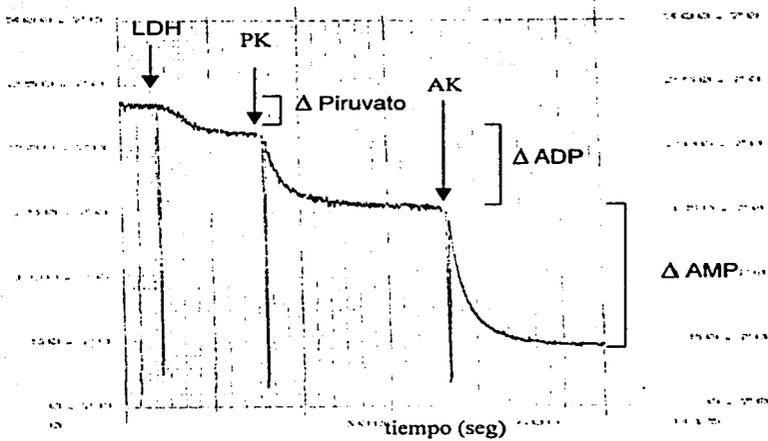
El citrato fue medido acoplado a su rompimiento por la citrato liasa en oxaloacetato y acetato. La reducción del oxaloacetato a malato fue seguida por la desaparición de NADH catalizada por la malato deshidrogenasa. El medio de reacción contenía glicina 160 mM, $ZnCl_2$ 19 mM; pH 7.8.



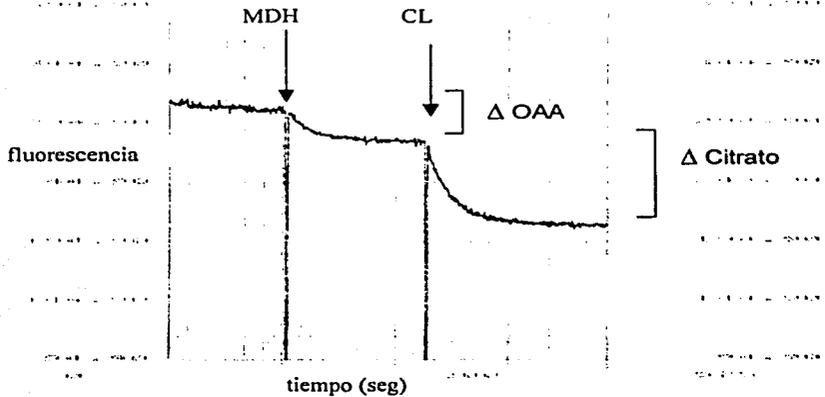
El fosfato intracelular fue medido coloriméticamente de acuerdo a Sumner (1964), en el medio, que contenía (en concentración final): molibdato de amonio, 2.75 %; sulfato ferroso; 1.66 % y H_2SO_4 , 3.29 N; la absorbancia fue medida a 660 nm.



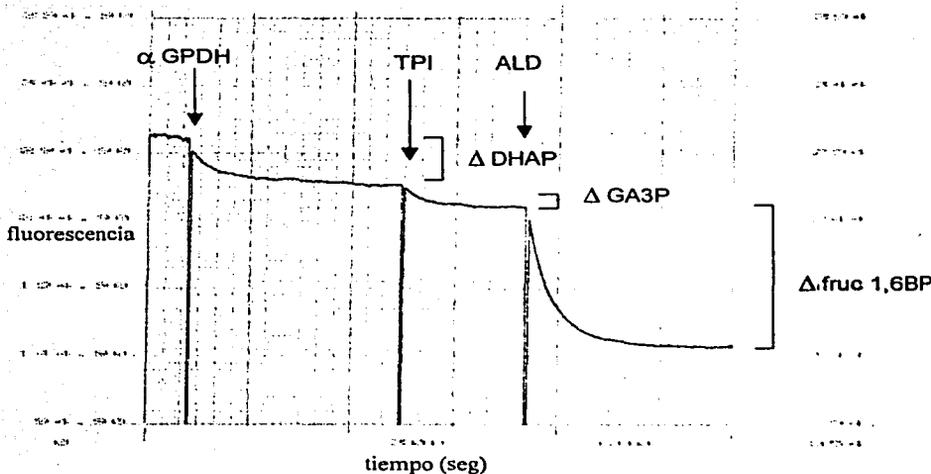
Trazo 2. Trazo representativo de la determinación de glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato y ATP de un extracto celular.



Traza 3. Trazo representativo de la determinación de piruvato, ADP y AMP de un extracto celular.



Traza 4. Trazo representativo de la determinación de oxaloacetato y citrato de un extracto celular.



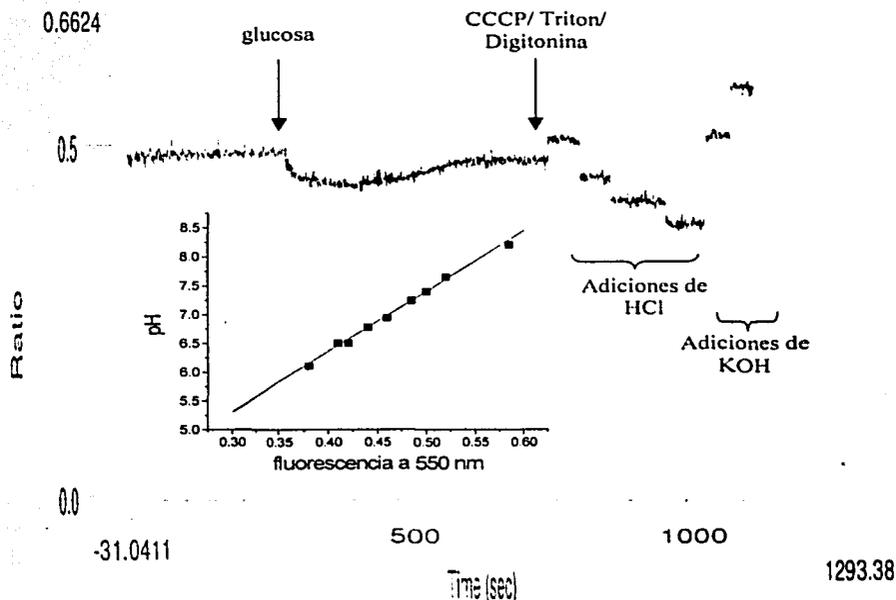
Trazo 5. Trazo representativo de la determinación de dihidroxiacetona fosfato, gliceraldehido 3-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato de un extracto celular.

MEDICIÓN DEL pH INTRACELULAR

Se incubaron 3×10^8 células con $3 \mu\text{M}$ de BCECF/AM ($2'$, $7'$ bicarboxietil-5(6) carboxifluoresceína acetometil éster) en medio Krebs-Ringer modificado con la adición de 0.2% de BSA y 1.0 mM de EGTA durante 25 minutos a 30°C . Las células posteriormente fueron centrifugadas a 2000 rpm y lavadas con medio salino conteniendo 0.2% de BSA y 10 mM de EGTA.

Las determinaciones del pH fueron realizadas en las condiciones de las diferentes incubaciones y fueron registradas en un espectrofluorómetro con una longitud de onda de excitación de 500 nm y de emisión a 550 nm (sensible a pH). La duración del trazo fue de 15 minutos. Al finalizar el experimento se adicionaron $10 \mu\text{M}$ de CCCP, digitonina (Sigma Labs, 50% de pureza) 0.1% y Triton X-100 al 0.1% con la finalidad de permeabilizar todas las membranas y obtener un sistema homogéneo. Posteriormente se realizó una calibración

manual de la señal emitida a 550 nm al construir una curva de pH, que fue lineal entre pH 6.4 y 8.1, y se realizaron la interpolaciones correspondientes.



Trazo 6. Trazo representativo de la determinación del pH intracelular en células incubadas con glucosa. Con objeto de facilitar el análisis sólo se presenta la fluorescencia sensible a pH (550 nm) a través del tiempo. En el inserto se muestra la curva de calibración de la señal con respecto al pH.

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA PFK-I

La actividad de la enzima fue determinada en células tumorales permeabilizadas a solutos de bajo peso molecular, mediante la adición de digitonina 0.005%. Se midió la liberación de LDH y la actividad de la PFK I, como marcadores de la integridad de la

membrana a moléculas de alto y bajo peso molecular. Con la concentración de digitonina ensayada, la actividad de la PFK I fue cercana al 100% y la liberación de LDH menor al 4%.

Las condiciones en las que se ensayó a la enzima fueron cercanas a las encontradas en el citosol (300 mOsmolar; KCl, 150 mM; EDTA, 1 mM; HEPES, 20 mM; Mg^{++} libre, 1 mM libre; NADH, 0.1 mM; pH 7.25; 37 °C). La actividad de la enzima se determinó según métodos enzimáticos convencionales (Dunaway *et al.*, 1983), acoplado al consumo de la fructosa 1,6-bifosfato por la aldolasa, triosa fosfato isomerasa y α -glicerol fosfato deshidrogenasa, 0.4 U/ ml de cada una (este ensayo se usó en todos los casos, excepto al probar el efecto de la fructosa 1,6-bifosfato sobre la actividad de la enzima). La velocidad inicial se registró en un espectrofotómetro acoplado a la desaparición de NADH, con una longitud de onda de 340 nm.

Las enzimas utilizadas se encontraban en suspensión en 3.2 M de sulfato de amonio. Fueron desaladas, ya que el amonio es un activador importante de la PFK-I. Las enzimas del sistema de acoplamiento fueron pasadas través de una columna de Penefsky con Sephadex G25 o fueron dializadas contra el medio de reacción toda la noche a 4 °C (Reinhart *et al.*, 1980).

DETERMINACIÓN DE LA V_m Y K_s PARA LA FRUCTOSA 6-FOSFATO Y ATP

Las constantes de disociación de la enzima por sus dos sustratos fueron determinadas variando la concentración de cada uno y dejando la del otro fija y saturante (ATP 0.25 mM y fructosa 6-fosfato 0.7 mM). De esta manera también se pudo obtener la velocidad máxima (V_m o actividad específica) de la enzima en el extracto. Ya que la PFK I muestra cooperatividad positiva por la fructosa 6-fosfato, la curva de velocidad vs sustrato es sigmoideal, mientras que el ATP en altas concentraciones es un inhibidor alostérico. Se adicionó una concentración muy alta de un activador (AMP 1 mM) para facilitar el análisis de los datos. Con el activador ambas curvas fueron hiperbólicas y se analizaron por regresión no lineal y lineal.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN DE LOS EFECTORES DE LA PFK I

La PFK I es una enzima que muestra cooperatividad positiva sólo por uno de sus sustratos, la fructosa 6-fosfato. Los diferentes efectores de la PFK-I cambian la afinidad aparente de la enzima por fructosa 6-fosfato; los activadores disminuyen la K_{Sap} y los inhibidores la aumentan. La afinidad de la enzima por sus efectores alostéricos se determinó al variar la concentración de cada uno de estos y variar la concentración de este sustrato. El análisis se realizó mediante métodos lineales y no lineales.

El método de regresión no lineal se realizó al ajustar los datos a la ecuación del Modelo de la Transición Alostérica Concertada de Monod, Wyman y Changeaux, suponiendo enlazamiento exclusivo.

La ecuación para una enzima alostérica birreactante, que puede presentar cooperatividad positiva hacia los dos sustratos, que puede unir efectores (tanto inhibidores como activadores) de tipo K y que no muestra unión exclusiva es la siguiente (ver Apéndice 1):

$$v = \frac{V_m \alpha \beta (1 + \alpha)^{n-1} (1 + \beta)^{n-1} + I_0 c \alpha d \beta (1 + c\alpha)^{n-1} (1 + d\beta)^{n-1} \frac{(1 + \gamma)^n (1 + \phi)^n}{(1 + \epsilon)^n (1 + \lambda)^n (1 + \pi + \delta)^n}}{I_0 (1 + c\alpha)^n (1 + d\beta)^n \frac{(1 + \gamma)^n (1 + \phi)^n}{(1 + \epsilon)^n (1 + \lambda)^n (1 + \pi + \delta)^n} + (1 + \alpha)^n (1 + \beta)^n}$$

Donde V_m representa la actividad máxima de la enzima, las letras griegas representan los cocientes de saturación (ligando/ constante de disociación) -o concentración específica- de cada uno de los sitios de la enzima. Los cocientes α y β corresponden a los sitios catalíticos de los dos sustratos, γ y ϕ para los inhibidores y ϵ , λ , π y δ representan el cociente para los activadores. El número de protómeros que interactúan en la enzima queda indicado por n . Las constantes de enlazamiento no exclusivo hacia los sustratos (c y d) indican la relación de la afinidad hacia estos ligandos de las dos formas (c o $d = K_R/K_T$), de

tal forma que si esta constante es cero indica que la forma R es la única forma capaz de unir al ligando.

La unión de los efectores con la enzima ocurre de manera selectiva. Los activadores se unen a la forma R y los inhibidores a la T. Con esta lógica, los activadores disminuyen la relación de enzima inactiva/ activa (a pesar de que L_0 sea constante) y por lo tanto, en términos matemáticos dividen a L_0 . Los inhibidores promueven a las formas inactivas, y en la ecuación multiplican. En el caso de que dos o más efectores del mismo tipo compartan un sitio de unión, la forma de representarse es $(1 + \delta + \epsilon + \dots + n)^n$. En el caso de que la unión no ocurra en el mismo sitio la representación es el producto de las formas capaces de unir a este $(1 + \delta)^n(1 + \epsilon)^n(1 + \dots)^n(1 + n)^n$ (Segel, 1975).

En el caso de la PFK I los sustratos son fructosa 6-fosfato y ATP-Mg⁺⁺. La constante de enlazamiento no exclusivo en el caso del ATP es cercana a 1, es decir, ambas formas de la enzima tienen la misma afinidad. En el caso de la fructosa 6-fosfato es cercana a 0, es decir, la forma T no es capaz de unir a este sustrato. Debido a que $d = 0$ el segundo término del numerador de izquierda se elimina. Se agrega entre los efectores al ATP, que es un inhibidor en altas concentraciones, a pesar de ser sustrato. Ya que esta enzima es un tetramero $n = 4$. La ecuación resultante es la siguiente:

$$v = \frac{V_m \alpha \beta (1 + \alpha)^3 (1 + \beta)^3}{L_0 (1 + c\alpha)^4 \frac{(1 + \gamma)^4 (1 + \phi)^4}{(1 + \epsilon)^4 (1 + \lambda)^4 (1 + \pi + \delta)^4} + (1 + \alpha)^4 (1 + \beta)^4}$$

El análisis lineal se realizó mediante el gráfico de Búc. En este gráfico las abscisas al origen de la familia de rectas indican la K_d del efector alostérico. Al regraficar las ordenadas al origen contra la concentración de fructosa 6-fosfato se puede determinar el valor intrínseco de L o L_0 (cociente estado T_0 / estado R_0). El estado de oligomerización de la enzima se determina mediante el análisis lineal de Hörn-Bornig, en el que el inverso aditivo de la pendiente más uno indica la forma oligomérica de la enzima (Blangy, 1968; Segel, 1975).

Ecuación de Búc para inhibidores $\left(\frac{V\alpha - v}{v} \right)^{1/n} = (L\alpha)^{1/n} \frac{1}{K_i} + (L\alpha)^{1/n}$

Ecuación de Búc para activadores $\left(\frac{v}{V\alpha - v} \right)^{1/n} = \frac{1}{(L\alpha)^{1/n}} \frac{A}{K_a} + \frac{1}{(L\alpha)^{1/n}}$

Ecuación de Hörn-Bornig $\text{Log} \left[\frac{\alpha V_m}{v} - 1 - \alpha \right] = (1-n) \text{Log} (1+\alpha) + \text{Log } L'$

Donde $V\alpha$ representa la actividad máxima de la enzima en una concentración dada de sustrato al variar la concentración de un efector, $L\alpha$ representa el valor aparente de L al variar la concentración de un efector, y α representa el cociente sustrato/ K_d .

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL pH SOBRE LA V_m DE LA PFK-I.

El efecto del pH sobre la V_m de la enzima fue medido en el mismo medio de reacción mencionado con anterioridad (que contenía HEPES, 20 mM), con la adición de MES, 20 mM y PIPES, 20 mM. Los pK_a de los amortiguadores son, respectivamente, 7.5, 6.1, 6.8. Esta mezcla abarca un intervalo de pH amortiguado desde 5.1 hasta 8.5. El pH se varió en este intervalo. Para determinar la V_m se adicionó un exceso de activador (AMP 5 mM) y un exceso de los dos sustratos (ATP 0.7 mM y fructosa 6-fosfato 3 mM) para evitar interferencias por el grado de sigmoidicidad de la curva (que se encuentra determinado por la concentración de los ligandos y el valor de L_0). Cabe mencionar que el pH tuvo un efecto mucho mayor sobre la actividad de la PFK I que sobre las enzimas de acoplamiento, aún a pH 5.1.

RESULTADOS

EL GRADO DEL EFECTO PASTEUR EN LA LÍNEA TUMORAL AS-30D

Se determinó la velocidad de producción de ácido láctico de la línea tumoral AS-30D (figura 6A) en tres estados metabólicos diferentes: sin sustrato glicolítico en condiciones aerobias, en glicólisis aerobia y en glicólisis anaerobia (con glucosa en anoxia o con diversos inhibidores de la fosforilación oxidativa).

La velocidad de la glicólisis anaerobia es ligera, pero significativamente mayor, que la velocidad glicolítica aerobia, 8.68 ± 0.65 vs 7.26 ± 0.55 nmoles de lactato/ min 1×10^7 cels (media \pm E.S. en este y todos los casos; $P < 0.05$, $n=8$). La velocidad glicolítica aerobia es parecida a la encontrada en otros tumores de rápido crecimiento (Sweeney *et al.*, 1966; Greenhouse *et al.*, 1977; Scilowski *et al.*, 1984), siendo aproximadamente 2.5 veces mayor que la de hepatocitos (Sweeney *et al.*, 1966). La velocidad de producción de lactato en ausencia de glucosa es muy baja (0.04 ± 0.02 nmol/ min 1×10^7 cels) y puede provenir de la degradación de glucógeno o del glutamato y glutamina endógenos (Eigenbrodt *et al.*, 1985; Baggeto, 1992).

La diferencia encontrada en la producción de lactato en glicólisis anaerobia y aerobia indica un grado ligero de efecto Pasteur (figura 6). La evaluación de este fenómeno mediante el Porcentaje Relativo de Efecto Pasteur (figura 6B) mostró que estas células presentan un efecto Pasteur muy disminuido (8.5 ± 2.2 %) con respecto a células quiescentes normales, en donde varía entre 250-500 veces (Ramainah, 1972). El coeficiente de Meyerhof también mostró que el efecto Pasteur se encuentra disminuido; este cociente (0.045 ± 0.008) no rebasó el límite inferior de 0.33, en donde se considera que existe efecto Pasteur (figura 6C). Sin embargo, este índice hace varias suposiciones que no necesariamente son correctas, por las cuales no es considerado como una evaluación confiable: a) supone que el único sustrato para la fosforilación oxidativa es el piruvato proveniente de la glicólisis, y b) que por cada molécula de piruvato que se oxida se consumen 3 moléculas de oxígeno, de ahí que el límite sea 0.33. Sabemos que cada molécula de piruvato produce cuatro moléculas de NADH y una de FADH₂, por lo que la oxidación de cada molécula de piruvato debería consumir cinco átomos de oxígeno, entonces el límite donde el efecto Pasteur es evidente no debería ser 0.33, sino 0.2.

Cabe hacer mención que la anoxia y la inhibición de la fosforilación oxidativa por inhibidores específicos arrojaron exactamente los mismos resultados (figura 6B y 6C).

En otros tumores de rápido crecimiento como los carcinomas renales de rápido crecimiento, el sarcoma Flexner-Jobling o el sarcoma de Jensen se ha determinado que el grado del efecto Pasteur va del 20-33 %, aunque el coeficiente de Meyerhof sea tan alto como 0.8-1.3 (Ramainah, 1972).

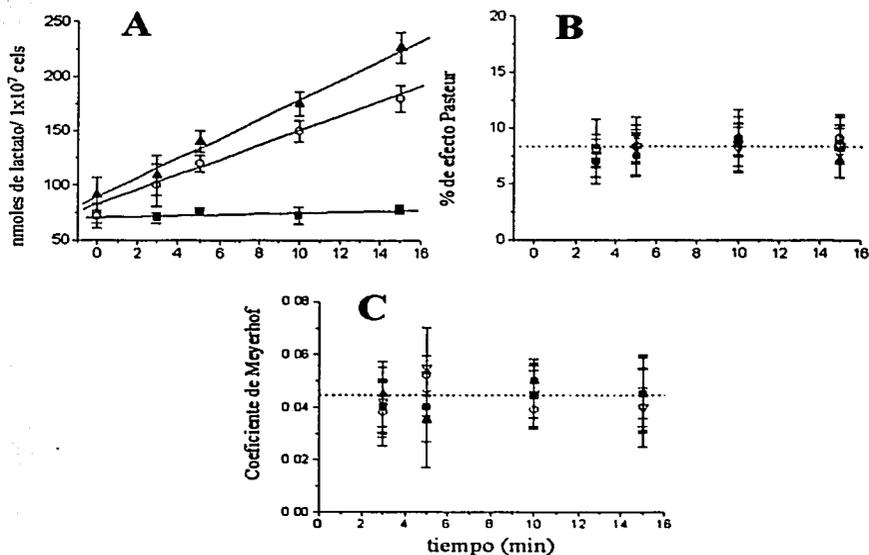


Figura 6. El grado de efecto Pasteur en la línea tumoral AS-30D. **A.** Producción de lactato de la línea AS-30D en ausencia de sustrato exógeno (■), en glicólisis aerobia (○) y en glicólisis anaerobia (▲). Comparación cuantitativa de la velocidad de producción de lactato en presencia de oxígeno contra la anoxia (X), en presencia de antimicina (■), KCN (○), oligomicina (▲), rotenona (□) mediante el Porcentaje relativo de efecto Pasteur (**B**) y el coeficiente de Meyerhof (**C**). La velocidad glicolítica fue medida en células AS-30D en suspensión en el medio Krebs-Ringer modificado descrito en la Metodología. La concentración de células fue de 2×10^8 cels/ml. Se adiciono en los casos pertinentes 5 mM de glucosa en condiciones aerobias o en condiciones anaerobias (burbujeo continuo de N_2) o al inhibir la fosforilación oxidativa en un 95% (con diversos inhibidores respiratorias, cuyas concentraciones se indican en la Metodología).

LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE LOS LIGANDOS DE LA PFK I

La concentración de los ligandos de la PFK I vinculados con la regulación de la PFK I y efecto Pasteur fueron determinados.

FRUCTOSA 6-FOSFATO Y FRUCTOSA 1,6-BIFOSFATO

En ausencia de glucosa extracelular, la concentración de fructosa 6-fosfato (0.012 ± 0.05 mM; $n=7$) y fructosa 1,6-bifosfato (0.15 ± 0.05 mM; $n=7$) se encontraron muy bajas lo cual corresponde con la baja actividad glicolítica encontrada en esta condición. A pesar de no presentar diferencia estadística, se encontró una tendencia de ambos intermediarios a disminuir con el transcurso del tiempo.

Después de la adición de glucosa las concentraciones intracelulares de fructosa 6-fosfato (figura 7A) y fructosa 1,6-bifosfato (figura 7B) aumentaron significativamente ($p < 0.01$) hasta alcanzar 3-5 y 50-100 veces, respectivamente, la concentración que se encuentra en células normales (Newsholme *et al.*, 1973; Woods *et al.*, 1973; Kashiwaya *et al.*, 1994). En ambos casos se alcanzó el estado estacionario después del minuto cinco. La cantidad de fructosa 1,6-bifosfato determinada en este trabajo es similar a la reportada para esta línea y otras líneas por diversos laboratorios (Greenhouse *et al.*, 1977; Reitzer *et al.*, 1979; Sussman *et al.*, 1980; Eigenbrodt *et al.*, 1985; Grivell *et al.*, 1995), aunque en otras líneas tumorales puede llegar a ser hasta del triple (Greenhouse *et al.*, 1977).

La concentración de ambos intermediarios glicolíticos no varió al exponer a las células a anoxia. Esta situación es contraria a lo que ocurre en células donde el efecto Pasteur se encuentra presente, en donde la anaerobiosis induce un decremento en la concentración de fructosa 6-fosfato y un aumento en la fructosa 1,6-bifosfato, como consecuencia de la activación de la PFK I (Barker *et al.*, 1966; Ramaiah, 1972; Tewjani, 1974; Lagunas *et al.*, 1985; Reibstein *et al.*, 1986).

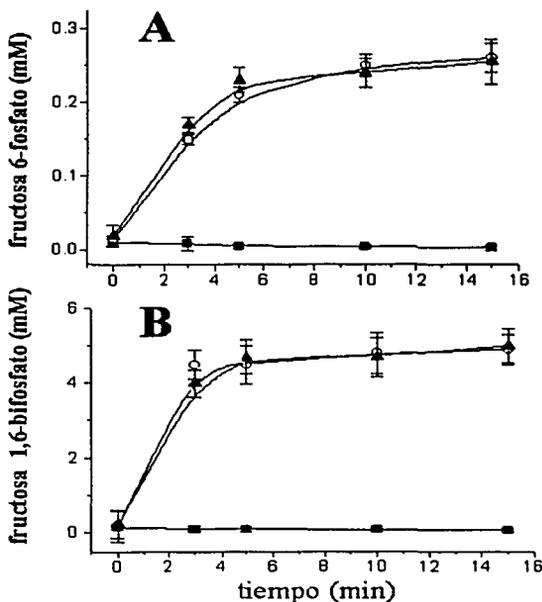


Figura 7. Nivel de intermediarios glicolíticos vinculados con la PFK I. **A.** fructosa 6- fosfato **B.** fructosa 1,6-bisfosfato. (■) sin sustrato exógeno, (○) glicólisis aerobia y (▲) glicólisis anaerobia. El volumen intracelular que se consideró fue de $2.3 \mu\text{l} / 1 \times 10^7$ cels (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000).

ADENÍN NUCLEÓTIDOS

Las células tumorales incubadas sin sustratos en condiciones aeróbicas mostraron durante los primeros minutos un aumento ($P < 0.01$; $n=8$) en la concentración de ATP (figura 8A), mientras que el ADP permaneció constante (figura 8B) y el AMP disminuyó ($P < 0.01$) de manera proporcional al aumento de ATP (figura 8C), sugiriendo una actividad alta de la adenilato cinasa. El aumento en la concentración de ATP podría deberse a la activación de la fosforilación oxidativa al iniciar el experimento, en donde la temperatura

cambia de 4 °C a 37 °C. Estos niveles de los nucleótidos de adenina son muy similares a los reportados para esta línea tumoral (Kovacevik *et al.*, 1991; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2001) y en algunas otras como Ehrlich (Wu, 1965; Traut, 1994), sarcoma 180 (Sussman *et al.*, 1980) o HeLa (Reitzer *et al.*, 1979).

Las células incubadas con glucosa en condiciones aerobias mostraron un contenido de ATP 40-45% menor que el de las células incubadas sin sustratos ($P < 0.05$; $n=7$), debido a la presencia de efecto Crabtree en esta línea (Rodríguez *et al.*, 2001). La concentración de AMP se encontró muy elevada en esta condición, alrededor de 10-20 veces, comparada con la de células normales (Traut *et al.*, 1994), y corresponde a la disminución en el ATP, indicando nuevamente la participación de la adenilato cinasa en el balance de los adenilatos. La concentración de ADP mostró un aumento ligero en los primeros minutos ($P < 0.05$), sin embargo recuperó su concentración basal al transcurrir el tiempo. Se ha propuesto que este aumento inicial es producto de la actividad de la hexocinasa y la fosfofructocinasa I en el estado de transición posterior a la adición de glucosa (Sussman *et al.*, 1980).

La concentración de ATP en las células incubadas con glucosa en anaerobiosis se encontró muy disminuida (25%; $P < 0.01$; $n=6$) con respecto a la condición control, que concuerda con el hecho de que la fosforilación oxidativa provee la mayor parte del ATP. A diferencia de lo encontrado en células normales (Ramaiah, 1972; Tewjani, 1978), la concentración de ADP y AMP no varió con la exposición a la anoxia, encontrándose valores idénticos en glicólisis aerobia y anaerobia.

La actividad glicolítica y la anoxia, de manera independiente entre sí, inducen la aparición de estados energéticos moderadamente bajos (figura 8 A y C). En estas condiciones se observa que la suma de los adenilatos (resultados no mostrados) disminuye, siendo especialmente evidente en tiempos largos. Esta disminución en la suma de los adenín nucleótidos ya se ha reportado en esta y otras líneas, y parece ser originada por la activación de la AMP desaminasa en estas condiciones (Kovacevic *et al.*, 1991).

Al compararse la constante de acción de masas ($AMP \times ATP / ADP^2$) con la constante de equilibrio de la adenilato cinasa (cercana a 1), se encontró que la primera es mayor que la segunda, hecho que aunque sorprende puede tener origen en que los diversos adenilatos pueden estar asociados a proteínas, por lo que aparentemente el equilibrio puede

ser rebasado, aunque la concentración de los adenilatos libres si podría aproximarse, los totales no.

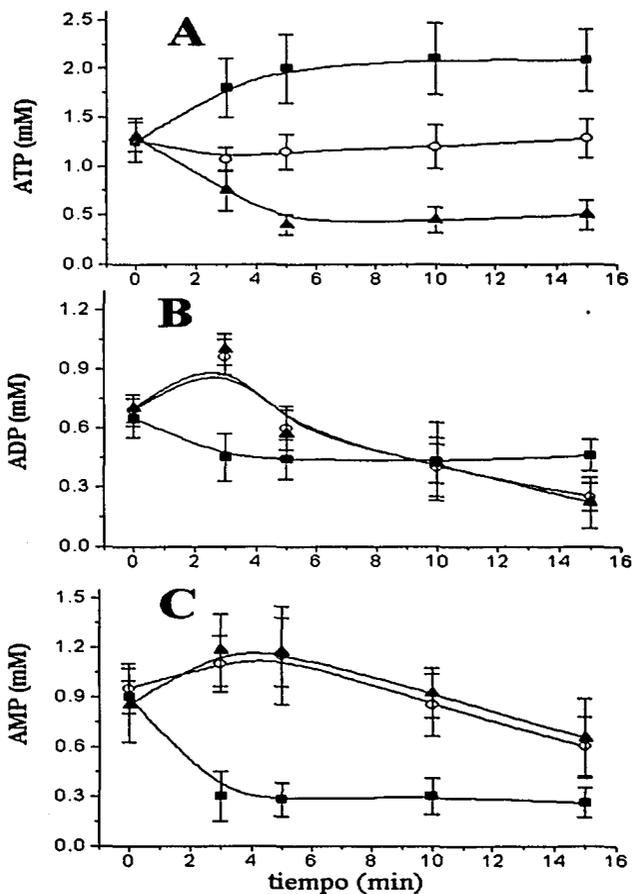


Figura 8. Adenilatos moduladores de la PFK I. A. ATP B. ADP C. AMP. (■) sin sustrato exógeno, (○) glicólisis aerobia y (▲) glicólisis anaerobia.

IONES INORGÁNICOS

Se determinó la concentración intracelular de los aniones inorgánicos asociados a la regulación de esta enzima.

pH

El pH intracelular (figura 9A) que se encontró en las células incubadas sin sustratos fue 7.26 ± 0.05 (n=6). Este pH es ligeramente más alcalino de lo reportado en la literatura para las células tumorales de rápido crecimiento (Stubbs *et al.*, 1994).

La adición de glucosa indujo un decremento transitorio en el pH intracelular para la células incubadas en aerobiosis (de 7.25 ± 0.06 a 6.81 ± 0.09 ; $p < 0.05$; n= 8), y permanente para las células incubadas en anoxia (6.78 ± 0.08 ; $P < 0.05$, n=9).

FOSFATO

La concentración intracelular de fosfato inorgánico (figura 9B) de las células incubadas sin sustrato fue de 1.95 ± 0.1 mM (n=7), similar a la de la línea sarcoma 180 (Sussman *et al.*, 1980). Este metabolito permaneció constante a través del tiempo en esta condición.

Al igual que en el caso del pH, en las células a las que se les adicionó glucosa se presentó una disminución abrupta en el contenido de fosfato de cerca del 60% (de 1.9 ± 0.14 a 0.7 ± 0.15 mM; $P < 0.01$; n=11). En el caso de las células incubadas en condiciones aeróbicas la disminución fue transitoria y en el caso de las células incubadas en anaerobiosis la disminución fue permanente (n=8). La disminución en la concentración de fosfato inducida por la actividad glicolítica es común en células tumorales y puede estar vinculada con el efecto Crabtree (Rodríguez *et al.*, 2001; Koobs, 1972; Sussman *et al.*, 1980).

Dada la similitud del comportamiento de ambos iones, el mecanismo de transporte de ambos parece ser afectado en el mismo nivel, el cual al parecer se relaciona con el

estado energético encontrado a efectuarse la actividad glicolítica o durante la anoxia (en donde el ATP disminuye).

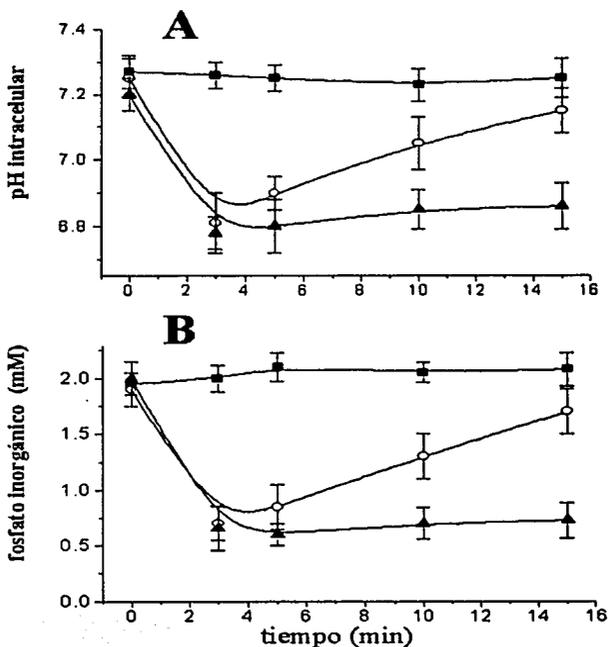


Figura 9. Concentración intracelular de iones inorgánicos efectores de la PFK I. A. pH B. fosfato inorgánico. (■) sin sustrato exógeno, (○) glicólisis aerobia y (▲) glicólisis anaerobia.

CITRATO

Se determinó la concentración intracelular de citrato (figura 10), siendo este el inhibidor más potente de la PFK I (Mansour *et al.*, 1972; Bloxham *et al.*, 1973; Kemp *et al.*, 1983). El citrato mostró un comportamiento independiente tanto de la presencia o

ausencia de oxígeno o glucosa, a diferencia de lo que ocurre en hígado, donde la concentración de este metabolito disminuye en anoxia y aumenta en aerobiosis (Ramaiah, 1972; Newsholme *et al.*, 1973; Tewjani, 1978). Este comportamiento en otros intermediarios de ciclo de Krebs (como el α -cetoglutarato, malato e isocitrato) ya ha sido reportado en otras líneas (Reitzer *et al.*, 1979), sin embargo no se tiene una explicación clara para este fenómeno.

La concentración de citrato tendió a disminuir al transcurrir el experimento. Sin embargo, nunca llegó a ser significativamente menor que al tiempo inicial.

En todas las condiciones ensayadas se encontró una concentración 8-10 ($n=7-9$) veces más alta que la encontrada en células normales (Newsholme *et al.*, 1973). Esta cantidad es similar a la reportada para esta misma línea -6.06 nmol/ mg prot- y para otras (Greenhouse *et al.*, 1976), aunque el contenido en las células tumorales puede ser hasta tres veces mayor.

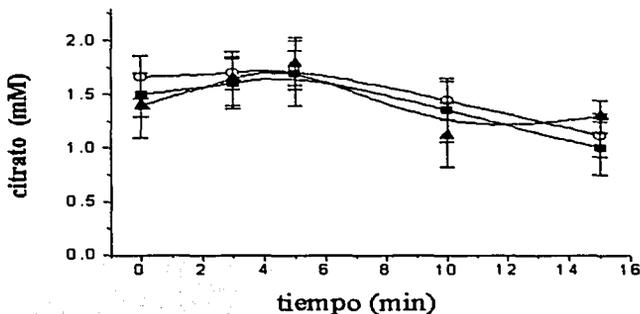


Figura 10. Concentración intracelular de citrato. (■) sin sustrato exógeno, (○) glicólisis aerobia y (▲) glicólisis anaerobia.

PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA PFK I TUMORAL

Existen pocos estudios detallados del comportamiento alostérico de la PFK I. En la mayoría de los estudios de esta enzima se evalúa cualitativamente el grado de activación o inhibición por sus diferentes ligandos, muchas veces en condiciones alejadas de lo que ocurre fisiológicamente, y se obtienen "constantes" aparentes, que dependen de la condición especial en la que se evalúa a la enzima (Kemp *et al.*, 1983; Dumaway *et al.*,

1985). Lamentablemente, en el caso de la PFK I tumoral se ha seguido esta dinámica y ciertamente se han encontrado diferencias en la respuesta de esta enzima entre las formas tumorales y normales (Wu *et al.*, 1966; Sumi *et al.*, 1972; Meldolesi *et al.*, 1976; Boscá *et al.*, 1982; Ui *et al.*, 1982; Staal *et al.*, 1985; Oskam *et al.*, 1985; Bossi *et al.*, 1989; Kole *et al.*, 1991; Sánchez-Martínez *et al.*, 1997, 2000). En un intento por cuantificar la alteración cinética de esta enzima hemos recurrido al análisis cinético detallado, tanto de los sitios catalíticos, como de los sitios alostéricos de la PFK I tumoral.

V_m Y K_s POR SUSTRATOS

Las células tumorales mostraron una actividad específica, o V_m (figura 11 A y B), de la PFK I 18-19 (n=22) veces mayor que la encontrada en hepatocitos, que concuerda con lo encontrado en esta línea por Nakashima *et al.* (1985). La K_s de la PFK I tumoral hacia sus sustratos fue: para la fructosa 6-fosfato $50 \pm 5 \mu\text{M}$, n=7 (figura 11A y tabla 2) y para el ATP de $20 \pm 3.5 \mu\text{M}$, n=8 (figura 11B y tabla 2). Estos valores son muy similares a los de las PFK I de otras fuentes ($K_{S\text{ATP}} = 19\text{-}30 \mu\text{M}$, $K_{S\text{IFP}} = 40\text{-}70 \mu\text{M}$) (Mansour *et al.*, 1972; Bloxham *et al.*, 1973; Goldhammer *et al.*, 1978; Stellwagen *et al.*, 1982).

AFINIDAD POR LOS EFECTORES ALOSTÉRICOS

Se evaluó la naturaleza alostérica de la PFK I tumoral mediante los métodos de análisis lineal y no lineal descritos en la Metodología, suponiendo que esta enzima sigue el modelo de la Transición Alostérica Concertada de Monod, Wyman y Changeaux. Se sabe que la PFK I de varias fuentes se ajusta a este modelo (Blangy *et al.*, 1968; Goldhammer *et al.*, 1978). Además, el análisis de algunos otros reportes (Reinhart *et al.*, 1980) con los dos métodos revelan que esta enzima sigue razonablemente bien el modelo de Monod, Wyman y Changeaux.

Al evaluarse la naturaleza alostérica de esta enzima proveniente de células tumorales se encontraron importantes diferencias en la afinidad de los sitios alostéricos. Un ejemplo completo de los análisis realizados es presentado en la figura 12. En estos resultados la afinidad de los sustratos y activadores de la enzima se refiere a la afinidad de

la forma R y la afinidad de los inhibidores a la afinidad de la forma T. Es decir, se supuso enlazamiento exclusivo.

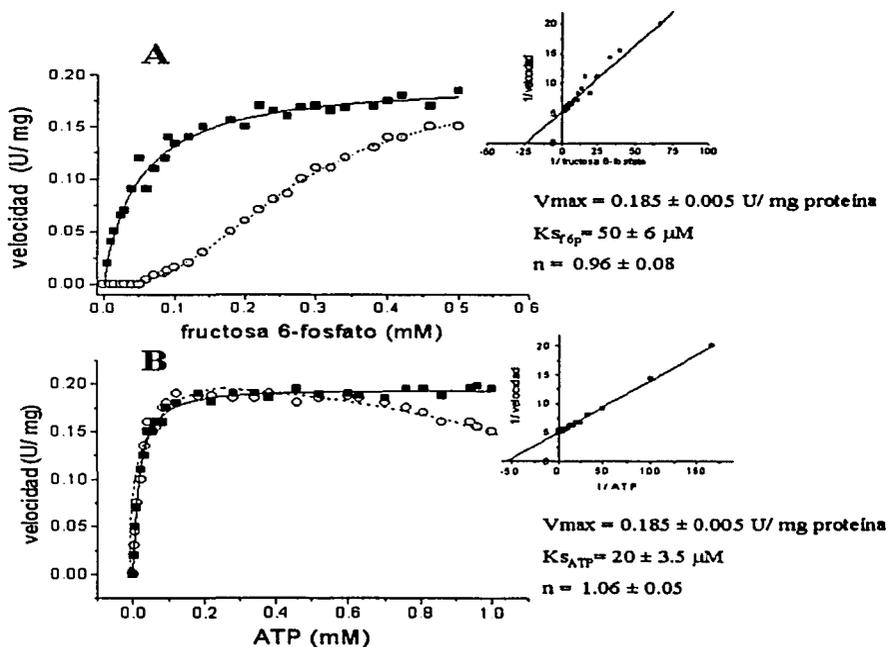


Figura 11. Análisis lineal y no lineal de la cinética del sitio catalítico de la PFK I tumoral. Se muestra la curva de velocidad vs sustrato (manteniendo el otro sustrato saturante: ATP 0.25 mM; fructosa 6-fosfato 0.7 mM) en dos condiciones con AMP (■) y sin AMP (○). La curva con AMP es hiperbólica y facilita el análisis por los dos métodos mencionados. Los parámetros obtenidos del ajuste mediante la ecuación de Hill se muestran en la parte derecha de cada gráfico, y en el gráfico de la derecha se muestra el análisis lineal de doble recíproco. Cuando el valor de $n=1$ la ecuación de Hill es equivalente a la ecuación de Michaelis-Menten, por lo cual el valor de K' puede considerarse como el valor de K_s . Ambos métodos arrojaron los mismos resultados. A. fructosa 6-fosfato B. ATP.

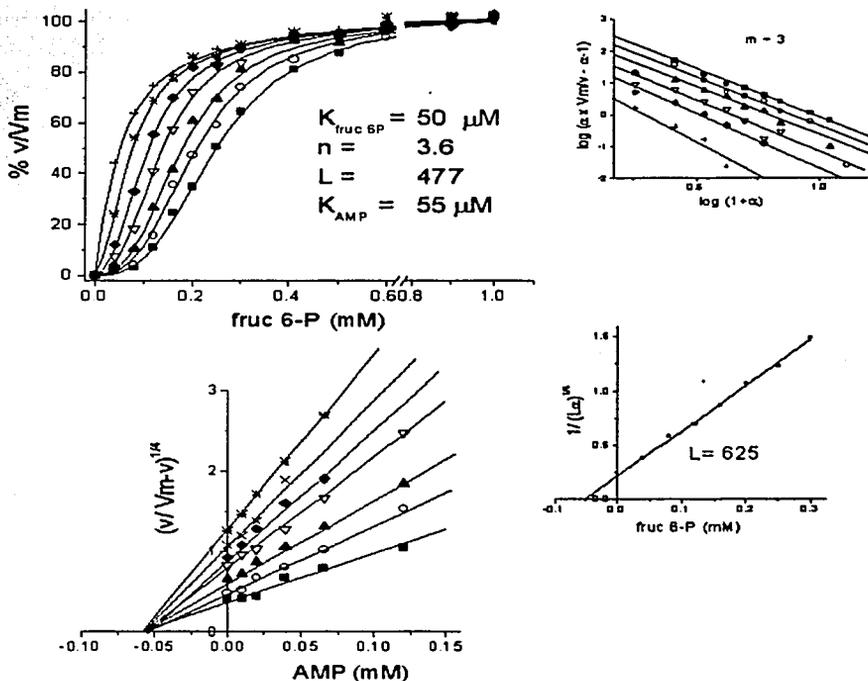


Figura 12. Análisis completo de la afinidad del sitio alostérico del AMP en la PFK I tumoral. La gráfica superior de la izquierda muestra la curva de velocidad vs fructosa 6-fosfato al variar la concentración de AMP entre 0 y 0.3 mM. El resultado del análisis lineal es mostrado en esta curva. En la figura superior de la derecha se muestra el análisis lineal según el método de Hörn-Bornig para determinar el estado de oligomerización de la enzima, la pendiente es cercana a -3 e indica un tetramero. En la figura inferior de la izquierda se muestra el gráfico de Búc para determinar la afinidad del sitio alostérico del AMP, el intersección de las líneas en la abcisa indica el inverso sumatorio de esta K_d . En el gráfico inferior de la derecha se muestra el regráfico de las ordenadas al origen con respecto a la concentración de fructosa 6-fosfato del gráfico de Búc, la ordenada al origen se relaciona con el valor de L . El análisis no lineal y lineal arrojó los mismos resultados. La concentración de ATP usada fue 0.25 mM.

Con motivos de comparación en la tabla 1 se muestran algunos valores de K_d para los diferentes efectores de enzimas normales (algunos de estos valores fueron calculados en este trabajo). En la tabla 2 y figuras 12-14 se presentan las K_d de la enzima tumoral hacia sus diversos efectores.

Ligando	K_d (μM)	referencia
ATP	350	1
	360	2
Citrato	310	1
ADP	250	1,3
AMP	275	1
fosfato	$3-4 \times 10^3$	1
	4.5×10^3	4
fructosa 2,6-bifosfato	1-3	1
glucosa 1,6-bifosfato	40	3
fructosa 1,6-bifosfato	65	1

Tabla 1. Afinidad de la PFK I no tumoral por los efectores alostéricos más importantes. Referencias: 1, Reinhart *et al.*, 1980 (PFK I hepática); 2, Goldhammer *et al.*, 1978 (muscular); 3, Blangy *et al.*, 1968 (*E. coli*); 4, Mansour *et al.*, 1972 (*S. cerevisiae*).

No se encontró un patrón general de modificación de la afinidad de los efectores alostéricos. Los sitios alostéricos de algunos efectores positivos como el AMP (figura 12) y ADP (figura 14) presentan una mayor afinidad que los de la enzima de fuentes normales (tabla 1 y 2), 3.8 y 3.6 veces, respectivamente. Para otro activador como la fructosa 2-6-bifosfato la afinidad se encuentra en el intervalo normal (figura 14). Para el fosfato, que también es un activador, se encontró una afinidad 3-4 veces menor (figura 14 y tabla 2).

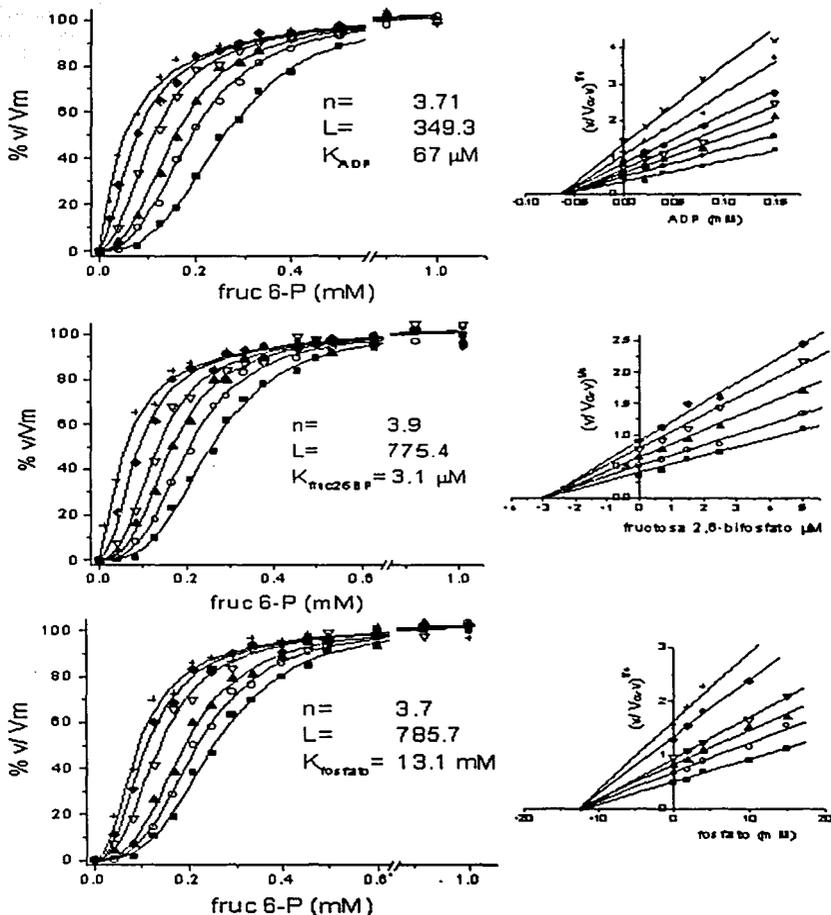


Figura 14. Afinidad de la PFK I tumoral hacia los activadores alostéricos. El análisis no lineal es presentado en la izquierda y el lineal (gráfico de Búcc) en la derecha. En la parte superior se muestra este análisis hacia el ADP, en el centro hacia la fructosa 2,6-bisfosfato y en la parte inferior hacia el fosfato.

En el caso de los inhibidores la enzima mostró una afinidad 3 veces menor ($n=5$) por el ATP (figura 13 y tabla 2). Para poder realizar un análisis confiable de la afinidad sitio inhibitorio del ATP la concentración de ATP se varió por encima de 10 K_s (0.25 mM) manteniendo saturando parte el sitio catalítico ($K_s=20 \mu\text{M}$) en todas las concentraciones probadas, 0.25-3 mM. Por fortuna la afinidad de los dos sitios es lo suficientemente diferente como para poder estudiar de manera independiente uno del otro. En el caso contrario se pudo haber recurrido al análisis no lineal mediante el modelo de Monod para dos sustratos cuando uno de estos es inhibitorio. En el caso del citrato ($n=6$) la afinidad fue solo ligeramente menor (figura 13 y tabla 2).

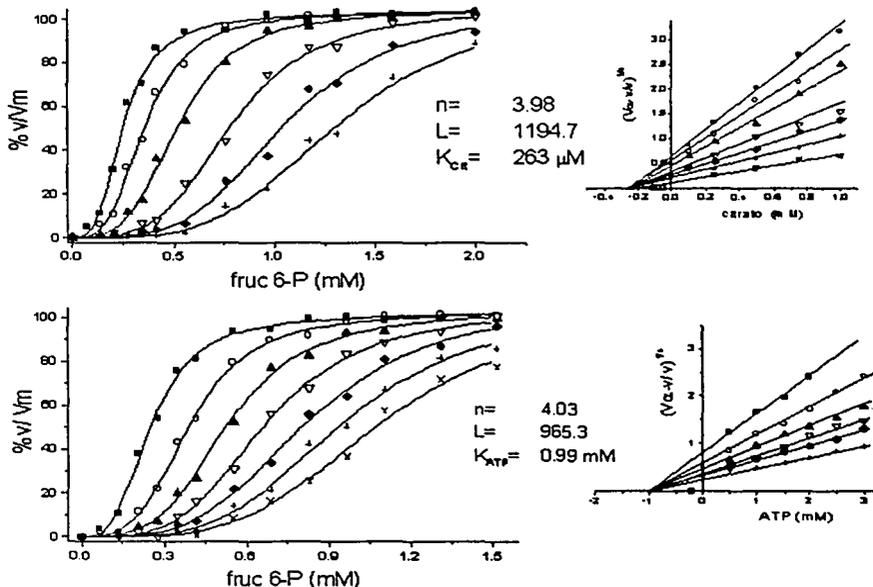


Figura 13. Afinidad de la PFK I hacia los inhibidores alostéricos. El análisis no lineal es presentado en la izquierda y el lineal (gráfico de Búci) en la derecha. En la parte superior se muestra este análisis hacia el citrato y en la parte inferior hacia el sitio alostérico del ATP.

Algunos otros valores, como en valor intrínseco de L y n , también fueron determinados usando los métodos lineales y no lineales (figuras 12-14). El valor de L (1120 ± 356 , $n = 22$) fue determinado con el análisis no lineal y con el regráfico de las ordenadas al origen obtenidas en el gráfico de Búc vs la fructosa 6-fosfato. Este valor se encuentra en el intervalo reportado 1×10^2 - 1×10^6 por otros autores para diversas PFK I (Blangy *et al.*, 1968; Stellwagen *et al.*, 1982). Se puede apreciar este número muestra una gran variabilidad al ser determinado mediante los dos métodos. El valor de n se determinó de las dos formas mencionadas, el análisis lineal se realizó mediante el gráfico de Hörn-Bornig, en donde el inverso sumatorio de la pendiente más uno indica el estado de oligomerización de la enzima, que fue el tetrámero en este caso ($n = 3.76 \pm 0.23$, $n = 22$).

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA

Se determinó el efecto del H^+ (pH) sobre la actividad de la PFK I ensayada en condiciones óptimas, con el objeto de sólo analizar el efecto sobre la V_m . El ensayo se realizó con la adición de 5 mM de AMP para llevar a la enzima al estado activo y con 0.7 mM de ATP y 2 mM de fructosa 6-fosfato para saturar los sitios catalítico. A pH 5.1 se adicionó una mayor cantidad de sustratos y activador y no encontraron cambios apreciables.

El H^+ puede influir sobre la K_d de los inhibidores y activadores, aumenta la afinidad hacia los inhibidores (que son unidos por histidinas, cuya protonación aumente la afinidad hacia los grupos cargados negativamente del ATP y citrato) y disminuye la de los activadores (Mansour *et al.*, 1972; Bloxham *et al.*, 1973; Kemp *et al.*, 1983). Se piensa que también podría tener efecto sobre L , ya que a pH ácido la forma T (dímero) es la forma que prevalece (Mansour *et al.*, 1972). En otras palabras, puede cambiar el equilibrio aparente entre las formas activas en inactivas, como cualquier otro efector, o puede cambiar el equilibrio intrínseco.

Se determinó que la enzima tumoral tiene un pK_{es1} (que corresponde al pK_a del aminoácido involucrado exclusivamente en la catálisis) de 6.97 ± 0.15 unidades de pH. Este pK_a corresponde a la histidina catalítica, encargada de arrancar un protón del carbono uno

de la fructosa 6-fosfato, que promueve el ataque nucleofílico al fósforo y del ATP (Mansour *et al.*, 1972; Bloxham *et al.*, 1973).

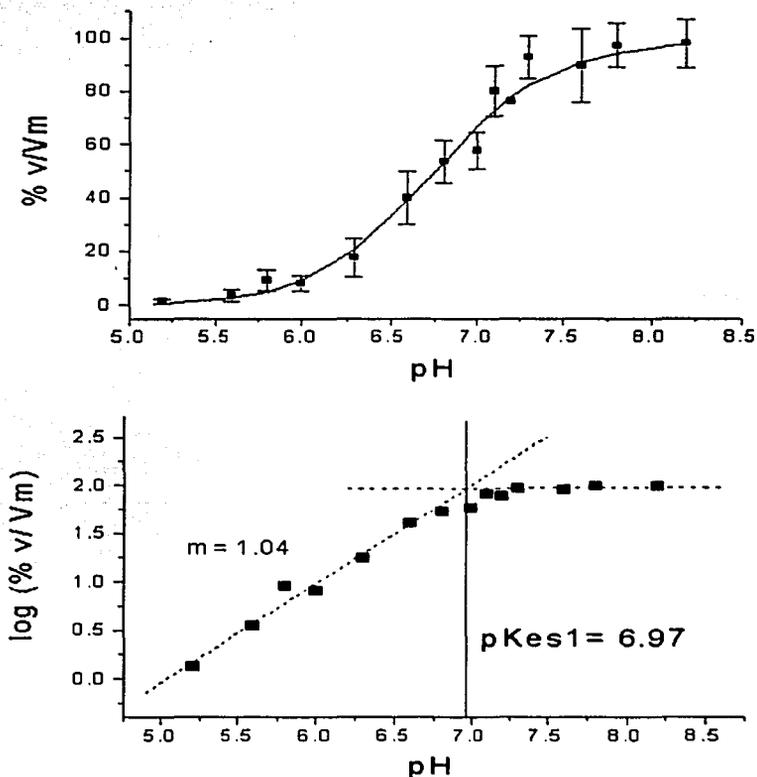


Figura 15. Efecto del pH sobre la actividad máxima de la PFK I tumoral. Los ensayos fueron hechos con un exceso de ambos sustratos y de activador (AMP) para evaluar solamente el efecto de la protonación sobre la V_m de la enzima. En la parte superior se muestra el perfil de pH de la actividad máxima de esta. En la parte inferior se muestra el gráfico de Dixon-Webb indicándose en este el pK_a del grupo vinculado con la catálisis.

Es importante señalar que este pKa es menor al de la PFK I normal, que oscila entre 7.3-7.6 (Layser *et al.*, 1969; Meldolesi *et al.*, 1979), e indica que el ambiente en el que esta histidina se encuentra es posible que sea más apolar, lo que facilita que el protón de la histidina se libere, puesto que la histidina protonada tiene una carga positiva neta y desprotonada no posee carga alguna. Al comparar a esta enzima contra las enzimas normales se observa una sensibilidad menor a la acidez de la enzima tumoral, que también se ha visto en otras enzimas de la glicólisis como la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Bagui *et al.*, 1997). Es posible que esto sea resultado del cambio en la isoforma, ya que se ha determinado que la subunidad C presenta un pKa similar al encontrado en tumores (Sánchez *et al.*, 2000).

COEFICIENTE DE SATURACIÓN *in situ* HACIA LOS LIGANDOS DE LA PFK I

Una vez que se conoce tanto la afinidad de la enzima hacia los ligandos más importantes, como la concentración intracelular de cada uno se puede determinar el coeficiente de saturación de cada uno *in situ* (tabla 2). En esta forma se puede evaluar cuantitativamente el grado de saturación de los sitios de unión hacia los ligandos y se puede predecir a grandes rasgos el comportamiento de la enzima en el interior de la célula. Se considera que una enzima se encuentra 90 % saturada por un ligando cuando el coeficiente de saturación es mayor que 10. Sin embargo, esto solo es cierto si la cinética de saturación es michaeliana (hiperbólica). En el caso de la PFK I solo la fructosa 6-fosfato no sigue este comportamiento.

	Sustrato		Ligando					Inhibidor		
	ATP	F6P	ADP	AMP	Activador Pi	F26BP	F16BP	ATP	Cit	H* **
[] _{in} (mM)	1.15 ± 0.02	0.25 ± 0.07	0.6 ± 0.05	1.2 ± 0.3	0.7 ± 0.1 2 ± 0.05	0.015*	5 ± 0.2	1.15 ± 0.02	1.2 ± 0.35	7.25 ± 0.006 6.8 ± 0.01
Kd (µM)	20 ± 3.5	50 ± 5	65 ± 7.5	55 ± 6	13000 ± 1200	3 ± 0.8	∞	1000 ± 130	265 ± 29	6.97 ± 0.015
[] _{in} / Kd	73	5	9.2	22	0.05- 0.15	5	0	1.1	4.5	

Tabla 2. Coeficiente de saturación *in situ* para la PFK I por sus ligandos. []_{in} , concentración intracelular; []_{in}/ Kd, coeficiente de saturación. *, tomado de Hue et al., 1994. **, unidades de pH.

En este caso nos importa saber el estado de saturación de la enzima en condiciones de glicólisis aerobia o anaerobia. El sitio catalítico se encontró saturado por ATP en ambas condiciones. Esta aclaración surge de la observación de que el ATP varió en respuesta a la anoxia, sin embargo, ya que la K_s hacia este es muy pequeña en ambas concentraciones la enzima se encuentra saturada. En el caso de la fructosa 6-fosfato el sitio no se encontró saturado aunque mostró un cociente alto. En los sitios inhibitorios del ATP y citrato no se encontró un cociente alto debido a que a pesar de que las concentraciones de ambos pudieran ser altas, la constante de disociación por ambos es a su vez muy alta, indicando poca afinidad. Para los activadores ADP y AMP se encontró un cociente muy alto, mucho mayor que el de los inhibidores. Ya que la relación $\text{ligando}/K_d$ para los sustratos y activadores es mayor a 5 en casi todos los casos, a excepción de la fructosa 6-fosfato y el fosfato, es posible que la enzima se encuentre totalmente activa *in situ* a pesar de la concentración alta de los inhibidores ATP y citrato.

DISCUSIÓN

EL GRADO DEL EFECTO PASTEUR EN LA LÍNEA TUMORAL AS-30D

La producción de lactato en la línea tumoral de rápido crecimiento AS-30D mostró un ligero aumento (8.5 %) al someter a las células a anaerobiosis. En condiciones aerobias el destino del piruvato se reparte entre la expulsión fuera de la célula en forma de lactato y la oxidación por la mitocondria, mientras que en condiciones anaerobias todo el piruvato es expulsado en su forma reducida (Ramanaiah, 1972). La diferencia del 8.5% corresponde con el porcentaje del piruvato que entra a la mitocondria, el cual en células tumorales de rápido crecimiento oscila entre 7-15% (Reitzer *et al.*, 1979; Eigenbrodt *et al.*, 1985). Por lo tanto la diferencia en la producción de lactato no parece deberse a la aceleración de la glicólisis en ausencia de oxígeno, sino a la ausencia de la fosforilación oxidativa. En este sentido no se puede considerar este porcentaje como efecto Pasteur, ya que la velocidad de la glicólisis no cambia.

Para que el efecto Pasteur tenga lugar deben de cumplirse dos condiciones: 1) la PFK I debe tener un alto coeficiente de control de flujo y 2) la actividad de esta cambia al variar la concentración de sus efectores. Es decir, la PFK I debe tener una elasticidad baja hacia la fructosa 6-fosfato y alta hacia sus efectores alostéricos, tanto inhibidores como activadores. Para que el flujo no se modificase en anoxia y anaerobiosis (como en el caso de las células tumorales) hay tres posibilidades: 1) que la PFK a pesar de ser una enzima regulatoria no cambie su actividad en estas dos condiciones, debido a sus propiedades regulatorias particulares, 2) que cambie su actividad en la transición aeróbica de la glicólisis pero no controle en un alto porcentaje el flujo y 3) que no controle el flujo y que no cambie su actividad en dicha transición.

LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE LOS LIGANDOS DE LA PFK I TUMORAL

FRUCTOSA 6-FOSFATO Y FRUCTOSA 1,6-BIFOSFATO

En ausencia de glucosa se encontraron niveles muy bajos de estos dos intermediarios (figura 7 A y B). Tras la adición de glucosa la concentración intracelular de

la fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato en presencia de glucosa se elevó varias veces (20 y 30 veces, respectivamente), hasta alcanzar niveles mucho mayores que los encontrados en tejidos normales (Newsholme *et al.*, 1973; Woods *et al.*, 1973; Kashiwaya *et al.*, 1994).

En tejidos normales que si presentan efecto Pasteur la concentración de estos dos intermediarios varía al exponerlos a anoxia y aerobiosis. La fructosa 6-fosfato se acumula en condiciones aerobias y disminuye en condiciones anaerobias, mientras que la fructosa 1,6-bifosfato se acumula en condiciones anaerobias y en aerobiosis disminuye. Este efecto es resultado de la activación de la PFK I en anaerobiosis y su inactivación en condiciones aerobias (Barker *et al.*, 1966; Ramaiah, 1972; Tewjani, 1974; Lagunas *et al.*, 1985; Reibstein *et al.*, 1986).

En el caso de la línea tumoral AS-30D la concentración de fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato no varió en glicólisis anaerobia y en aerobia, que concuerda con el hecho de que en estas células el efecto Pasteur se pierde, e implica que la actividad de la PFK I no cambia en las dos condiciones ya señaladas. También es importante señalar que si aún así la cantidad de estos dos intermediarios cambiase sin que se modificara el flujo indicaría que esta enzima no es un punto importante de control.

Si se considera por separado la concentración de los dos intermediarios se podría proponer que la alta concentración de estos y la alta afinidad de la enzima hacia estos ligandos (la K_s hacia la fructosa 6-fosfato es de $50 \mu\text{M}$ y la K_a de la fructosa 1,6-bifosfato en tejidos normales es de $65 \mu\text{M}$) conducirían a mantener en un alto grado activada a la PFK I *in situ*, como se ha sugerido (Eigenbrodt *et al.*, 1985, 1997). Sin embargo esta posibilidad se reduce a la activación homotrópica de la PFK I por la fructosa 6-fosfato, ya que la fructosa 1,6-bifosfato no es capaz de activar a la enzima tumoral en condiciones cercanas a las fisiológicas (Wu, 1966; Boscá *et al.*, 1982; Sánchez *et al.*, 1997, 2000), aunque en condiciones de alto ATP y/o bajo pH la activación por fructosa 2,6-bifosfato se vuelve evidente (Boscá *et al.*, 1982).

Por otro lado tal concentración de fructosa 1,6-bifosfato podría activar de manera accesoria a la PK, incrementando a su vez el flujo glicolítico. Eigenbrodt *et al.* (1985) ha sugerido que la isoforma de la PK presente en células tumorales de rápido crecimiento presenta activación heterotrópica por este intermediario glicolítico y que podría ser un

punto importante de control, sobre todo cuando el flujo glicolítico es bajo. Sin embargo, nuestras observaciones (resultados preeliminares) y de algunos otros laboratorios (Guminska *et al.*, 1996) indican que la cinética de esta enzima es hiperbólica y se ha demostrado que la actividad de esta es varias veces mayor que el flujo por la vía.

ADENILATOS

Al examinar el nivel de los adenín nucleótidos con respecto al tiempo en cada condición metabólica ensayada se encontraron patrones importantes que describen a grandes rasgos el metabolismo de la adenosina (figura 16) en células tumorales de rápido crecimiento. Es importante señalar que la concentración de Mg^{++} libre en estas células fue aproximadamente 1 mM y que no varía mucho al cambiar la condición experimental (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2001). Por lo tanto la especie la concentración de los quelatos Mg^{++} -adenín nucleótidos (las especies biológicamente activas) depende de la concentración de cada adenín nucleótido.

Existe una relación inversa entre la concentración de AMP y ATP (figura 8 A y C), lo cual sugiere que la adenilato cinasa se encuentra activa. De hecho se ha demostrado que esta enzima en células tumorales se encuentra en niveles normales o ligeramente disminuidos (Pedersen, 1978). La actividad de esta enzima es función de la constante de acción de masas (Γ), que a su vez es función de la actividad de las enzimas o procesos que utilizan o producen ATP, ADP o AMP. La adenilato cinasa forma una parte importante en el balance de los adenín nucleótidos en células normales, manteniendo constantes los niveles de ATP intracelular (Newsholme *et al.*, 1973).

Cuando las células fueron incubadas sin sustratos en condiciones aerobias se observó un incremento en la concentración de ATP y decremento en el AMP, mientras que el ADP permaneció constante. En esta condición el AMP es tomado por la adenilato cinasa y convertido en ADP, que a su vez es tomado por la fosforilación oxidativa para producir un total de dos moléculas de ATP, por una invertida. En esta condición el flujo de los adenín nucleótidos se dirige hacia la formación de ATP, a costa del consumo de AMP (figura 16).

En la condición de glicólisis aerobia la adición de glucosa induce un decremento en la concentración de ATP, debida principalmente al efecto Crabtree (Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2001), el nivel de AMP aumenta y el de ADP, tras un ligero aumento transitorio, regresa a su concentración original. La disminución en la producción de ATP (suponiendo que el consumo de ATP es constante) debería conllevar a la acumulación del ADP, lo cual no ocurre y en cambio el AMP es el que incrementa su concentración. Es posible que la adenilato cinasa en estas condiciones ayude a mantener la concentración de ATP por encima de lo esperado, a pesar de que la vía que lo produce mayoritariamente se encuentre inhibida.

En células normales este tipo de homeostasis de los adenín nucleótidos también ocurre (Newsholme *et al.*, 1973). La diferencia con las células tumorales estriba precisamente en que en condiciones de bajo aporte energético la concentración de los productos de la hidrólisis de ATP estimulan a los procesos productores de este metabolito, como la glicólisis, a través de la activación por ADP, AMP o fosfato.

En glicólisis anaerobia se observa el mismo fenómeno de redistribución de los esqueletos de adenosina entre sus diversas formas fosforiladas (ATP, ADP y AMP), con la diferencia de que el ATP disminuye aún más, sin que el aumento en la concentración de AMP sea tan paralelo.

Se ha propuesto que el aumento transitorio en la concentración de ADP tras la adición de glucosa (tanto en glicólisis aerobia como anaerobia) es provocado por la actividad de la HK y PFK I en el estado de transición posterior a la adición de glucosa (Sussman *et al.*, 1980).

En un gran número de células tumorales la fosforilación oxidativa aporta la mayor parte del suministro de ATP, que varía del 50-80% (Greenhouse *et al.*, 1977; Pedersen, 1978; Reitzer *et al.*, 1979; Nakashima *et al.*, 1985). En esta línea el aporte de ATP por la fosforilación oxidativa es aún más alto (Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2000). Por este motivo se observa un nivel bajo de ATP en glicólisis anaerobia. Sin embargo, la concentración de ATP en esta condición (25% del original) es más alta de la que debería haber si sólo la glicólisis produjera ATP (10%), es decir, hay un 15% que no produce ni la glicólisis ni la fosforilación oxidativa. Es posible que en esta condición de bajo aporte energético la adenilato cinasa sea capaz de usar el ADP para formar ATP de manera alterna a la

glicólisis. A diferencia de lo ocurrido con los otros adenín nucleótidos (y de hecho con el resto de los ligandos de la PFK I, como se verá más adelante) sólo el ATP mostró una variación al exponer a las células a anoxia.

La disminución en la concentración de ATP posterior a la adición de glucosa se debe a que estas células presentan efecto Crabtree, es decir, la fosforilación oxidativa se inhibe parcialmente por la actividad glicolítica (Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2001). El porcentaje de inhibición de la fosforilación oxidativa (60%) corresponde a la disminución en la concentración de ATP, si se toma en cuenta el aporte de la glicólisis y de la adenilato cinasa.

En condiciones donde el aporte energético es bajo se encontró una disminución en la suma de los adenilatos (resultados no mostrados), de manera dependiente del tiempo. En varios tipos de líneas tumorales se ha encontrado activa a la AMP desaminasa, la cual es activada por ADP y por la disminución en el pH, e inhibida por ATP y fosfato. Esta enzima se ha visto implicada en la disminución de los adenilatos a través del tiempo en diversas condiciones (Kovacevic *et al.*, 1991).

La suma de los adenín nucleótidos en hepatocitos también disminuye en respuesta a la disminución en el estado energético celular. Esta disminución es provocada en conjunto por la AMP desaminasa y la 5' nucleotidasa que se activa en las mismas condiciones que la deasminasa (Woods *et al.*, 1973).

Una pregunta que surge de esta discusión es ¿por qué en el hospedero la célula tumoral no muere si tiene un aporte continuo de glucosa?. En líneas tumorales como Ehrlich o AS-30D la disminución en los adenín nucleótidos puede ser evitada al adicionar glutamina, aspartato o adenosina (Kovacevic *et al.*, 1991). En la sangre del hospedero se encuentra una concentración considerable de estos metabolitos (Traut, 1994; Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2000). En estas condiciones la célula tumoral puede sobrevivir.

Ahora bien, si se considera la concentración de cada uno de los adenín nucleótidos encontrada se pueden llegar a conclusiones poco claras con respecto a la actividad de la PFK I bajo dichas condiciones, ya que se encuentran altas concentraciones de ATP y AMP que tienen efectos contrarios sobre la cinética de la PFK I.

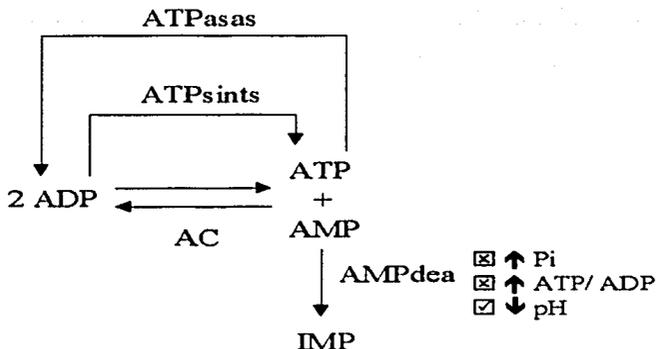


Figura 16. Metabolismo de la adenosina en células tumorales de rápido crecimiento. AC, adenilato cinasa; AMPdea, AMP desaminasa; ATPasas, proteínas celulares diversas que utilizan ATP (bomba Na^+/K^+ , ribosomas, polimerasas, etc.); ATPsints, enzimas del metabolismo energético capaces de sintetizar ATP ($\text{F}_0\text{-F}_1$ ATPasa y PK principalmente).

IONES INORGÁNICOS

En el caso de los iones inorgánicos moduladores de la PFK I como el H^+ y el fosfato se encontraron comportamientos casi idénticos al variar la condición experimental. En ambos casos se encontró una disminución del pH y fosfato tras la adición de glucosa, que fue permanente en el caso de la condición de glicólisis anaerobia y transitoria para la glicólisis aerobia. Estas variaciones pueden tener dos orígenes independientes: 1) por velocidad alta en el estado de transición de la glicólisis, que conlleva a la acumulación transitoria de sus productos (H^+) y a la disminución en sus sustratos (fosfato) o 2) por la disminución en la actividad de transporte de estos iones que depende de ATP, el cual a su vez varía dependiendo de la condición metabólica (debido al efecto Crabtree y anoxia). El transporte de fosfato al interior de la célula al igual que la regulación de la concentración de H^+ depende de energía, ya sea directamente del ATP (bomba) o de un potencial (antiportador o simportador), que a su vez es mantenido por la actividad de bombas de iones diversos (Madshus, 1988).

La primera posibilidad no es viable, puesto que en la condición anóxica no se recupera el nivel de los dos iones a pesar de que la velocidad de la glicólisis es prácticamente idéntica a la condición aeróbica. La segunda opción es la más probable, ya que en las dos condiciones se registra cambio en la concentración de ATP, es decir, la manera en que la glicólisis aerobia y anaerobia tiene efectos sobre la concentración de el fosfato y H^+ es a través del transporte de éstos, que depende de ATP, que a su vez es modificado por la condición experimental. La baja en el ATP promovida por la glucosa y la anoxia permite que la membrana plasmática se despolarize, lo cual afecta el transporte de solutos a través de la membrana, no sólo de estos iones, sino también el de algunos aminoácidos (Madshus, 1988; Shrode *et al.*, 1997).

No obstante que la cinética de estos iones depende a *grosso modo* de la concentración de ATP, se puede encontrar una correlación mucho mejor si se considera la relación ATP/ADP, siendo esta igual a la encontrada por separado en los dos iones, aunque la interpretación es más difícil, ya que esto implica que las bombas pueden ser controladas por la relación ATP/ADP o que el ADP puede tener una concentración tan alta como para inhibirlas.

FOSFATO

La homeostasia del fosfato podría tener un papel importante en la regulación del metabolismo energético en células tumorales a nivel del efecto Crabtree (Koobs, 1972) y en células normales en el efecto Pasteur (Lagunas *et al.*, 1985). La concentración de este sustrato de la glicólisis baja al adicionar glucosa a las células, y es posible que quede atrapado en forma de los intermediarios glicolíticos fosforilados, que a la postre sirven para sintetizar componentes celulares diversos (Koobs, 1972). Se ha planteado que la principal fuente de fosforilación de estos es la HK, que al estar unida a la membrana mitocondrial (figura 4) permite que la canalización del ATP intramitocondrial hacia la biosíntesis de diversos precursores se favorezca (Bustamante *et al.* 1977; Golshani *et al.*, 1997).

La disminución en la concentración provoca (al menos parcialmente) que la fosforilación oxidativa se inhiba y a la glicólisis no la afecta. Esto indica que la K_s de la

gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por fosfato es menor al del transportador de fosfato mitocondrial (Kooobs, 1972) y por eso la glicólisis puede tener la misma velocidad mientras que la fosforilación oxidativa se inhibe. Por otro lado, no obstante que el fosfato recupere su concentración la glicólisis no se acelera paralelamente al aumento en el fosfato, lo cual sugiere que el coeficiente de control de flujo de las enzimas que lo tienen como sustrato, como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o de las que es un efector alostérico, como la PFK I, es bajo.

pH

Al igual que en el caso del fosfato, la disminución en el pH no afectó la producción de lactato, e incluso en la condición donde el pH permaneció ácido se registró un ligero aceleración, esto es, la disminución en el pH no afecta la velocidad de la glicólisis. Se ha determinado que la sensibilidad de las enzimas tumorales de la glicólisis hacia el pH ácido, como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Bagui *et al.*, 1999) y la PFK I (Staal *et al.*, 1978, este trabajo) es menor con respecto a sus contrapartes normales, lo cual les permite funcionar en estas condiciones sin modificar de manera importante su actividad. La PFK I de músculo tiene un pK_{es1} de 7.3; a pH de 6.8 la actividad se encuentra inhibida en un porcentaje cercano al 80% (Layser *et al.*, 1969). Si esta enzima se encontrara en el interior de la célula tumoral seguramente la glicólisis se inhibiría al exponer a las células a glucosa o anoxia, pero esto no sucede con la enzima tumoral lo que indica que la enzima es más resistente al pH, o que no controla el flujo o ambas posibilidades.

Recientemente en nuestro grupo de trabajo determinamos que la respiración mitocondrial es sensible a las variaciones en el pH que ocurren en la célula tumoral (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2001), esto sugiere que además de que las enzimas de la glicólisis son menos sensibles al pH bajo que las enzimas normales, también son menos sensibles que las enzimas de la fosforilación oxidativa.

En células tumorales de rápido crecimiento, y especialmente en las que forman nódulos, se piensa que los mecanismos reguladores del pH interno (como las bombas o antiportadores de H^+) tienen mayor capacidad que el de las células normales (Madhus,

1988; Sttubs *et al.*, 1994,1995) debido al gradiente inverso de pH que se encuentra en estas células, en donde el pH intracelular es más básico que el extracelular a pesar de las altas cantidades de lactato que se producen tanto por la glicólisis como por la glutaminólisis.

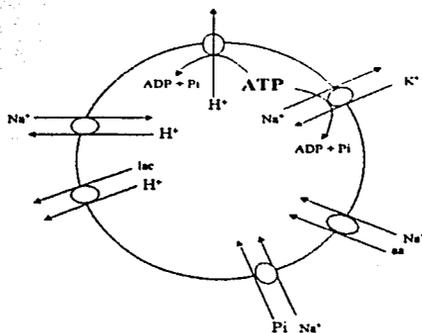


Figura 17. Transporte de iones a través de la membrana plasmática.

CITRATO

A diferencia de lo que ocurre para los otros ligandos de la PFK I el citrato no mostró variaciones de acuerdo con la condición experimental. Sólo tendió a disminuir a través del tiempo sin llegar a ser significativamente diferente del tiempo inicial. Este fenómeno ya ha sido reportado para otros intermediarios del ciclo de Krebs (Reitzer *et al.*, 1979).

En células normales, que sí presentan efecto Pasteur, la concentración de citrato disminuye en anoxia y aumenta en aerobiosis (Barker *et al.*, 1966; Ramanaiah, 1972; Tewjani, 1974; Reibstein *et al.*, 1986), debido a esto la actividad de la PFK I cambia de acuerdo a la tensión de oxígeno.

Es posible que la mayoría del citrato encontrado sea el citosólico, ya que este tipo de células expulsan el citrato mitocondrial al citosol y se debe a que el transportador de citrato tiene una mayor afinidad por el citrato intramitocondrial que en células normales, $K_s = 75$ vs $250 \mu\text{M}$ (Baggeto, 1992). En AS-30D el piruvato que entra a la mitocondria aparece preferente como citrato y sólo 1/6 es oxidado por el ciclo de Krebs (Briscoe, 1994), y es expulsado para la síntesis de lípidos. Estas observaciones concuerdan con la propuesta

del ciclo de Krebs truncado de las células tumorales (Pedersen, 1978; Baggeto, 1992; Kelleher *et al.*, 1991; Briscoe, 1994)

Se encontró una concentración muy alta de citrato que podría inhibir la actividad de la PFK I en un alto porcentaje, aún en presencia de activadores en concentración fisiológica. Esta concentración tan alta es necesaria ya que estas células presentan una síntesis incrementada de ácidos grasos y colesterol (Baggeto, 1991, 1992; Kelleher *et al.*, 1991; Briscoe, 1994) y es posible que la interrupción del ciclo de Krebs o truncamiento sea una adaptación a tales requerimientos.

En las células que presentan efecto Pasteur la anaerobiosis incrementa la concentración de los activadores como el ADP, fosfato inorgánico y AMP, y la de los inhibidores como el ATP y citrato disminuye. Esto activa a la PFK I observándose como una disminución en la concentración de la fructosa 6-fosfato y aumento de la fructosa 1,6-bisfosfato, sustrato y producto respectivamente. En las células tumorales sólo el ATP sigue esta dinámica. En consecuencia, los intermediarios glicolíticos tampoco varían. Sin embargo, es posible que esta enzima no ejerza un alto control en el flujo glicolítico y/o que no responda a la variación en los ligandos.

La sola comparación de la concentración de los ligandos de la PFK I no brinda una explicación clara del por qué se pierde el efecto Pasteur en células tumorales. Por el contrario el análisis es más complejo, pues algunos efectores deberían activar al máximo a esta enzima y algunos otros la deberían inhibir totalmente. Además, no se puede apreciar un solo ligando que pudiera estar en tan alta concentración como para nulificar el efecto de otros. Por este motivo se realizó un estudio cinético de la enzima tumoral.

LAS PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA PFK I TUMORAL

Se encontraron algunas diferencias en la cinética de la PFK I tumoral. Estas diferencias no están relacionadas con el sitio catalítico, que parece ser idéntico al de la enzima normal, ya que tiene la misma afinidad hacia sus sustratos y no se han reportado diferencias en su secuencia (Sánchez *et al.*, 2000).

V_m Y K_s POR SUS SUSTRATOS

La actividad específica de esta enzima es 18-19 veces mayor que la encontrada en hepatocitos (Nakashima *et al.*, 1985) y con respecto al flujo de la vía es 25 veces mayor. El análisis de la V_m permite determinar, según la bioquímica clásica, los pasos limitantes en una vía metabólica (Newsholme *et al.*, 1973) y son las enzimas de la vía que presentan una menor capacidad catalítica o actividad específica, lo cual se atribuye con frecuencia a enzimas cooperativas. Sin embargo, para una enzima alostérica este parámetro no parece ser tan trascendente ya que la actividad puede estar inhibida en un 95%, indicando que esta podría ser una enzima "paso limitante".

La concentración de enzima es un factor importante en la cinética de enzimas alostéricas (Sols *et al.*, 1981; Aragón *et al.*, 1983; Mansour *et al.*, 1972), ya que determina el estado de oligomerización entre las subunidades, disminuyendo el valor intrínseco de L₀ (enzima activa/ inactiva). El efecto de la oligomerización al disminuir el valor de L₀ es el de volver a la enzima más insensible a los inhibidores alostéricos, sin afectar la afinidad de esta. La actividad incrementada de la PFK I en los tumores de rápido crecimiento es resultado de una mayor cantidad de PFK I (Dunaway *et al.*, 1983) y no a una diferencia en la *k_{cat}* de la enzima tumoral, ya que no se han detectado diferencias en el sitio catalítico (Sánchez-Martínez *et al.*, 2000). La concentración incrementada de enzima también podría ser un factor importante en la pérdida del efecto Pasteur.

PROPIEDADES REGULATORIAS DE LA PFK I TUMORAL

Las propiedades regulatorias de la PFK-I tumoral son diferentes a las de otras PFK-I. Se encontró una afinidad 3-4 veces mayor hacia al ADP y AMP, que concuerda con otras observaciones (Wu *et al.*, 1966; Meldolesi *et al.*, 1976; Staal *et al.*, 1985; Oskam *et al.*, 1985; Kole *et al.*, 1991). El ADP y AMP comparten un sitio de activación alostérica (Dunaway, 1985b), lo que indica que este sitio puede estar alterado en la enzima tumoral.

En este trabajo, así como en otros (Vora *et al.*, 1985; Staal *et al.*, 1985; Oskam *et al.*, 1985; Kole *et al.*, 1991) se determinó que la afinidad del sitio inhibitorio del ATP es 3

veces menor. Lo cual concuerda con que a pesar de que el ATP si presentó una variación por la anoxia no haya ocurrido el efecto Pasteur.

En el caso de otros efectores no se encontraron alteraciones, como para el sitio inhibitorio del citrato, aunque en otros reportes se ha mencionado que la enzima es menos sensible a este inhibidor (Vora *et al.*, 1985; Staal *et al.*, 1985; Oskam *et al.*, 1985; Kole *et al.*, 1991). La manera en el que el sitio inhibitorio del citrato se encuentra afectado es difícil de predecir ya que otro efector como el fosfoenolpiruvato, que también comparte este sitio, presenta una mayor afinidad en la enzima tumoral (Boscá *et al.*, 1982; Sánchez-Martínez *et al.*, 1997, 2000).

La afinidad de esta enzima hacia su activador más potente, la fructosa 2,6-bifosfato se encontró en el intervalo normal, aunque también se ha propuesto que esta enzima es más sensible que la normal (Boscá *et al.*, 1982; Oskam *et al.*, 1985; Kole *et al.*, 1991; Sánchez-Martínez *et al.*, 1997, 2000). Coincidiendo con el caso del citrato también se ha encontrado que otro efector que comparte el sitio cambia su afinidad. En este caso la fructosa 1,6-bifosfato es la que aparentemente es capaz de unirse a la enzima pero no ejerce activación alostérica, lo cual llevó a pensar a los autores que en realidad cada bifosfato se une a un sitio diferente, aunque fuera de esta observación los datos indican que comparten un sólo sitio (Mansour, 1972). Además se ha determinado que la fructosa 1,6-bifosfato si es capaz de activar a bajo pH o en altas concentraciones de ATP (Sánchez-Martínez *et al.*, 2000).

También se encontró una afinidad disminuida hacia el fosfato, cuyo sitio de unión aún no se conoce. La pérdida de la susceptibilidad hacia el fosfato podría ser una respuesta adaptativa de la glicólisis, ya que en este tipo de células existen variaciones en la concentración de fosfato provocadas por esta vía (Koobs, 1972; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2001).

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PFK I

Se determinó también el pK_{es1} de la PFK I con la intención de determinar por qué esta enzima aparentemente no cambia su actividad en el pH al cual la actividad de una enzima normal se encontraría 80% inhibida. El objetivo de esta sección se centró en la V_m de la enzima, aunque el pH podía tener efectos sobre todos los parámetros cinéticos de una

enzima alostérica. El pK_{es1} obtenido para la enzima tumoral fue 0.3 unidades de pH más bajo que el de enzimas normales, indicando un ambiente más polar en la enzima tumoral. Este pK_a corresponde a la histidina catalítica ya mencionada en la Introducción. Ya que esta enzima tiene un pK_{es1} menor que el de las enzimas normales esto hace que funcione mejor a pH bajo que sus contrapartes.

Como ya se trató en la introducción no se conocen con certeza la bases estructurales de las alteraciones en la regulación de esta enzima y en esta parte sólo se numeran las posibilidades .

- 1) Mutaciones puntuales en los sitios de unión de los efectores alostéricos (Sánchez-Martínez *et al.*, 2000)
- 2) Modificación postraduccional por adición o delección de segmentos grandes (Sánchez-Martínez *et al.*, 1997). Esto podría modificar el cambio conformacional en la transición alostérica o sesgar el equilibrio hacia una forma.
- 3) Modificación covalente, principalmente fosforilación (Staal *et al.*, 1987).
- 4) Aparición de isoformas con características regulatorias particulares.
- 5) Cambio en la cantidad de enzima, lo cual permite la oligomerización, tornándola menos sensible a los inhibidores.

En su conjunto, la concentración intracelular de los ligandos de la PFK I y la afinidad de la enzima por estos indican que la enzima se encontraría totalmente activa en el citosol de la célula tumoral. Se encontraron cocientes de saturación cercanos o superiores a 10 para la mayoría de los sustratos o efectores positivos, mientras que para los inhibidores este cociente fue menor a 5.

Se determinó la afinidad de la PFK I tumoral por sus efectores. No se encontró un patrón general de modificación de dicha afinidad, ya que algunos mostraron un incremento en esta, para otros no se afectó y para algunos disminuyó. En casos particulares es claro que la modificación en la afinidad obedece a los requerimientos celulares. El análisis grueso de los coeficientes de saturación de la enzima tumoral indican que se encuentra totalmente activa *in situ*.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

LA ACTIVIDAD *in situ* DE LA PFK I TUMORAL

Con los datos obtenidos (tabla 1 y 2) se simuló la actividad *in situ* de la PFK I tumoral y de la enzima normal (figura 18).

Como ya se había predicho (con base en la concentración intracelular de los intermediarios glicolíticos relacionas con la PFK I) la actividad *in situ* de esta enzima en glicólisis aerobia y anaerobia no cambia si se considera que el pH no varía en estas condiciones (figura 18 curvas A y B). Aunque si se considera que si lo hace se obtiene una velocidad 30% menor (curva D).

La velocidad alcanzada por la PFK I con la concentración encontrada en el citosol de ambos sustratos (fructosa 6-fosfato=0.25 mM y ATP= 1 mM) es aproximadamente 25 (o 15 si se considera la disminución en el pH) veces más alta que el flujo glicolítico registrado. En una enzima alostérica es difícil aplicar el precepto de que las enzimas regulatorias muestran velocidades máximas semejantes al flujo, o que entre las enzimas de la vía que tienen la menor velocidad. La V_m de este tipo de enzimas puede ser muy alta, pero *in situ*, dada la concentración de sus ligandos (como los inhibidores), podría tener la menor actividad entre el resto de las enzimas de la vía siendo el sitio más importante de control. En este caso se encontró que la PFK I se encuentra totalmente activa y se observa con claridad que la velocidad *in situ* de esta es mucho mayor que el flujo glicolítico y es probable que esta enzima no contribuya en alto porcentaje al control en la vía.

En la curva C se presenta la actividad de la PFK I en la condición sin sustrato en aerobiosis. Aún en esta condición la enzima se encontraría totalmente activa, es decir el equilibrio de las formas estaría desplazado a la forma R. La actividad de esta enzima sería muy baja en esta condición por la concentración tan baja del sustrato.

Con motivos de comparación la actividad de la enzima hepática también fue evaluada mediante este método. Si se expone al mismo ambiente que la enzima tumoral (curva E) es aparente que muestra una gran diferencia en su cinética, desplazándose a la derecha. Esto corrobora que la PFK I tumoral es una forma diferente al de otras. Esta curva puede ser interpretada de otra manera, la cual es considerarse que la subunidad hepática simplemente se encuentra sobreexpresada.

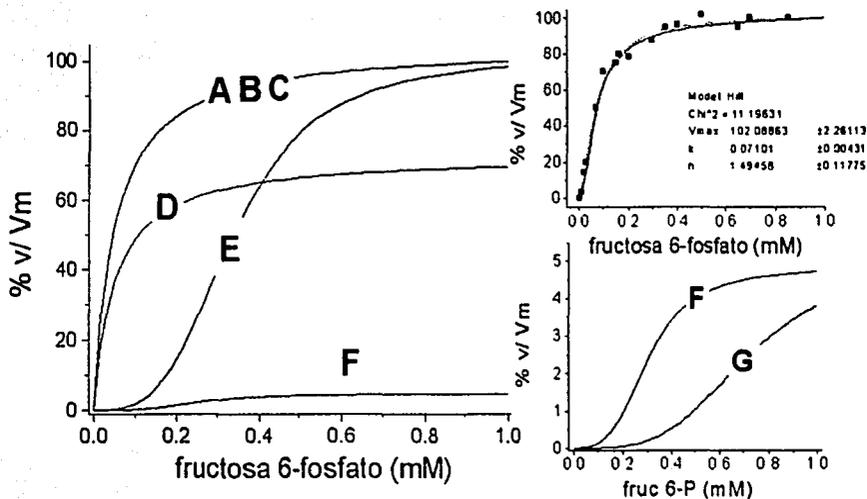


Figura 18. Simulación de la actividad in situ de la PFK I en células tumorales y normales. En la figura superior de la derecha se presenta una comparación entre el resultado experimental (línea punteada) obtenido al variar la concentración de fructosa 6-fosfato en presencia de ATP (0.25 mM), AMP (1 mM) y citrato (1 mM) y la simulación de la actividad de la PFK I (línea continua). Se observa que la predicción se ajusta con bastante cercanía a los datos experimentales. En las siguientes dos gráficas se presentan la simulación de la enzima bajo diversas condiciones al variar el sustrato por el que muestra cooperatividad (fructosa 6-fosfato), los parámetros usados en la ecuación (descrita en métodos) se enlistan en las tablas 1 y 2. **A** Curva de la actividad de la enzima tumoral con la concentración de ligandos encontrados en glicólisis aerobia. **B** Enzima tumoral en presencia de la concentración de ligando encontrados en glicólisis anaerobia, suponiendo que el pH no cambia (pH 7.25). **C** Enzima tumoral en presencia de los ligandos encontrados en la condición sin sustrato en presencia de oxígeno. **D** Enzima tumoral en la condición de glicólisis anaerobia, donde el pH baja, suponiendo que el efecto del pH es únicamente sobre la Vm de la enzima. **E** Enzima hepática sobreexpresada en el tumor (Vm tumor, Kd hepatocito) en glicólisis aerobia. **F** Enzima hepática expresada (Vm y Ks hepatocito) en el tumor en glicólisis aerobia. **G** Enzima hepática en condiciones de glicólisis aerobia.

En la curva F se muestra la actividad de la enzima hepática sin encontrarse sobrepresada (Vm hepatocito), siendo básicamente la curva anterior en una escala menor. Al simularse la actividad de la enzima hepática en el interior de un hepatocito (curva G) la curva se desplaza aún más a la derecha, siendo resultado de un menor contenido de ADP, AMP, fructosa 2,6-bifosfato y un contenido mayor de ATP.

LA REGULACIÓN DE LA PFK I TUMORAL *in situ*

Al profundizar en el análisis de la simulación de la actividad de la PFK I en condiciones fisiológicas se pudieron determinar tanto el tipo de mecanismos no covalentes que operan en la enzima tumoral para regular su actividad como la magnitud de estos. Este problema fue abordado desde el punto de vista de la elasticidad de esta enzima hacia varios de sus ligandos.

La elasticidad de una enzima se refiere a la respuesta de esta al cambiar la concentración de uno de sus ligandos en condiciones donde se alcanza un estado estacionario, de tal forma que puede tener valores que varían desde 0-1, para los sustratos o activadores, en el caso de enzimas Michaelianas y en el caso de enzimas alostéricas varía desde 0 hasta n (número de protómeros interactuantes). En el caso de los inhibidores o productos la elasticidad varía entre 0 hasta -n.

Se simuló la actividad de la enzima con la concentración de ligandos encontrados en la condición de glicólisis aerobia al variar uno a uno cada ligando entre 0 y 20 o 100 Kd y con estos datos se construyó la tabla 3. Se muestra que para la mayoría de los ligandos de la enzima la elasticidad es cercana a 0, lo cual quiere decir que a pesar de que la concentración aumente mucho la actividad de la enzima no cambia. Esta tabla indica que la regulación alostérica por los efectores que regulan a esta enzima en células no tumorales (ADP, AMP, fosfato, hexosas bifosfato, citrato, etc) no es el mecanismo más importante de regulación de la enzima tumoral *in situ*.

Tipo de ligando	Ligando	Elasticidad teórica
Sustrato	ATP	~ 0
	fructosa 6-fosfato	0.55
Inhibidor alostérico	ATP	~ 0
	citrato	~ 0
	pH	0.53
Activador alostérico	AMP	~ 0
	ADP	~ 0
	fructosa 2,6-bifosfato	~ 0
	fosfato inorgánico	~ 0

Tabla 3. Elasticidad teórica de la PFK I tumoral *in situ* por sus ligandos.

Se determinó que los ligandos para los cuales la enzima presenta la mayor elasticidad son el pH y la fructosa 6-fosfato. Esto indica que mecanismos de regulación modulan a la PFK I.

Es difícil explicar la causa por la que el pH modula la actividad de la PFK I. Sin embargo, la inhibición de esta enzima podría disminuir el flujo glicolítico y a su vez disminuir la concentración de H^+ , para evitar que la concentración llegue a ser tóxica (Ramanaiah, 1972). Aunque esto sólo tendría lógica si esta enzima tuviera un alto coeficiente de control de flujo, lo cual parece no ocurrir.

La elasticidad tan grande que mostró esta enzima hacia su sustrato sugiere que el mecanismo de regulación más importante de esta es la disponibilidad de sustrato. Si se toma en cuenta la actividad que mostró en cualquier condición y la elasticidad de esta hacia el sustrato se concluye que esta enzima no participa de manera importante en el control de la glicólisis en células tumorales y que por lo tanto éste puede ser el mecanismo de pérdida del efecto Pasteur.

Se simuló la actividad de la PFK I tumoral *in situ*. Se determinó que en las condiciones evaluadas esta enzima se encuentra totalmente activa y no cambia su actividad en la transición aeróbica de la glicólisis, hecho por el que el efecto Pasteur se pierde. Los mecanismos de regulación que operan en la enzima tumoral son diferentes

de los de las enzimas normales, siendo básicamente la disponibilidad de sustrato y el cambio en el pH. La actividad tan alta que presenta y la magnitud de la elasticidad de esta enzima hacia su sustrato apuntan a que esta enzima no es un punto importante de control en las condiciones evaluadas.

CONCLUSIONES

El mecanismo de la pérdida del efecto Pasteur en células tumorales de rápido crecimiento involucra la pérdida de la regulación normal de la PFK I, lo que impide que esta enzima cambie su actividad en la transición aeróbica de la glicólisis.

Hay 2 tipos de factores que impiden que esto ocurra, los factores extrínsecos a la enzima y los intrínsecos a ésta. Entre los factores extrínsecos se ubica el metabolismo general de la célula tumoral, ya que la concentración de la mayoría de los efectores de esta enzima no cambió por exposición a la anoxia, a excepción del ATP. Además, se encontró una concentración de los efectores que en conjunto favorecen la actividad de la PFK I (figura 18 curva F y G, donde se compara el citosol tumoral y el del hepatocito). Sin embargo, el cambio en la concentración de ATP podría provocar un ligero efecto Pasteur si el tumor tuviese una enzima "normal". Entre los factores intrínsecos que impiden que la PFK I cambie su actividad al activarse o inhibirse la fosforilación oxidativa se encuentra la modificación en la afinidad de esta enzima hacia algunos de sus efectores normales, como el aumento en la afinidad por el ADP y AMP y la disminución hacia el ATP. El resultado final de la interrelación de estos dos factores es que la enzima no responda a la regulación alostérica negativa (como la que debería ocurrir en el efecto Pasteur) de sus inhibidores, encontrándose totalmente activa *in situ*, y presentando una actividad varias veces mayor que el flujo, lo cual sugiere que no es un buen candidato para ser uno de los sitios importantes de control de la glicólisis.

En esta situación, el principal mecanismo de regulación de la enzima es por disponibilidad de sustrato (y por el pH). Esto implica que presenta una elasticidad alta hacia la fructosa 6-fosfato e indica que puede reajustarse a varios estados estacionarios si se cambiase la cantidad de enzima presente, es decir, tiene un coeficiente de control de flujo bajo.

En conclusión, esta enzima no es un buen candidato para ser una de las enzimas regulatorias de la glicólisis en tumores de rápido crecimiento y es por eso que los procesos normales que producen ATP como la glicólisis y la fosforilación oxidativa no tienen una relación normal a través del efecto Pasteur.

PERSPECTIVAS

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES ESTRUCTURALES QUE MODIFICAN LA CINÉTICA DE LAS ENZIMAS GLICOLÍTICAS

En este y otros trabajos se ha puesto en evidencia las alteraciones cinéticas de la PFK I en tumores, sin embargo solo en este caso se conoce la magnitud de las alteraciones. Por tal motivo es importante extender estos estudios hacia otras líneas tanto tumorales como normales, para poder establecer un patrón de pérdida del efecto Pasteur y alteraciones en la cinética de la PFK I.

Otras enzimas de la glicólisis también presentan alteraciones en su cinética. La HK, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y PK pertenecen a este grupo. Sin embargo, tampoco se conoce la magnitud del cambio inducido por el estado neoplásico debido a que no se han realizado los estudios cinéticos rigurosos pertinentes.

Las bases que conllevan a la alteración en las propiedades regulatorias de la PFK I, HK, PK y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa no son claras. No obstante, se ha especulado que la fosforilación, la proteólisis parcial, la asociación con organelos, entre otras, promueven que estas enzimas adquieran nuevas características. Se considera que la exploración del efecto de estas modificaciones sobre la cinética de estas enzimas arrojará datos valiosos. En particular, el efecto de la fosforilación (en sus diversas variantes) sobre la cinética de la PFK I, y el efecto de la unión a la membrana externa mitocondrial de la HK sobre las constantes de disociación por sus diferentes ligandos.

En el caso de algunos efectores se encontraron diferencias importantes en la respuesta de la enzima tumoral. Hasta el momento sólo se ha descrito que el sitio regulatorio del ATP podría estar modificado. Mediante los estudios de la estructura primaria y secundaria de los sitios alostéricos de estos efectores, por mutagénesis dirigida y por modificación química se podría determinar la contribución cada aminoácido a la unión de los diversos efectores.

ESTUDIO CINÉTICO DE LA PFK I

En este trabajo se trató de enfatizar que no se han caracterizado cuantitativamente las propiedades regulatorias de la PFK I de diversos organismos y tejidos, ya que no se ha aplicado el modelo de la Transición Alostérica Concertada de Monod, o no se ha sabido aplicar. En este sentido, sólo se ha especulado que las distintas isoformas podrían presentar propiedades regulatorias diferentes entre sí. Como una perspectiva importante se plantea la de conocer con exactitud las propiedades regulatorias de los homotetrámeros de cada subunidad (M_4 , L_4 y C_4) y tal vez las de algunos híbridos como los encontrados en el corazón o cerebro, con el propósito de entender la relevancia fisiológica de las presuntas diferencias y su relación con la especialización de cada tejido.

Tampoco se ha podido evaluar con detalle la manera en la que el pH tiene efectos sobre la actividad de esta enzima, dada la complejidad en el desarrollo de un modelo, ya que el pH puede tener efectos sobre casi todos los parámetros en la ecuación de Monod (V_m , K_s , L , K_a , K_i , c , n y en el propio estado de protonación de los sustratos, que también influye en su unión). Sin embargo, es posible diseccionar cada uno de los componentes (al mantener los otros constantes usando otros ligandos) y examinar en el efecto de la protonación sobre cada uno.

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CONTROL DE FLUJO DE LA GLICÓLISIS EN CÉLULAS NORMALES Y TUMORALES

Se ha supuesto por varios años que la PFK I controla totalmente la transición aeróbica de la glicólisis, lo cual se ha ido deduciendo por medidas indirectas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que en tejidos donde hay efecto Pasteur esta enzima no es la que controla en mayor porcentaje el flujo glicolítico, lo cual abre la posibilidad de que esta enzima no sea el único blanco del efecto Pasteur. Se propone entonces el estudiar con base en la teoría moderna del control metabólico la transición aeróbica de la glicólisis para identificar los sitios de control y la manera en que el control se distribuye en dicha transición.

Por otro lado, en este trabajo se ha venido proponiendo que la PFK I no controla de manera significativa el flujo glicolítico en células tumorales. Además, la HK y la PK tampoco parecen buenos candidatos, dadas sus propiedades regulatorias y cantidad de enzima presente. Si los puntos normales o comunes de control de la glicólisis no lo son los mismos que en células normales, entonces ¿quién controla?. Para contestar esta pregunta se plantea conocer en diversas condiciones metabólicas (importantes por su contribución al desarrollo de la enfermedad -como la anoxia-) en cuáles enzimas recae el control de la glicólisis.

La relación recíproca de las vías que conforman el metabolismo energético se reacomoda en las células tumorales. El efecto Pasteur se pierde, esto indica que la fosforilación oxidativa ya no ejerce un control negativo significativo sobre la glicólisis y al contrario, la glicólisis es la que ejerce el mayor control negativo sobre la fosforilación oxidativa, es decir, hay efecto Crabtree. El mecanismo que lleva a que se establezcan estas nuevas relaciones no se conoce y se pretende estudiarlo con detalle.

APÉNDICE.

DEDUCCIÓN DE LA ECUACIÓN DE VELOCIDAD PARA LA PFK I

El modelo de la Transición Alostérica Concertada propone que la enzima se origina como consecuencia de la presencia simultánea de dos formas intercambiables, que existen en un equilibrio termodinámico. Las formas son: la forma T (Tensa) que es incapaz de unir al menos a uno de varios sustratos y la forma R (Relajada) que es catalíticamente activa. La relación que existe entre la constante de disociación de ambas formas se representa con el coeficiente de unión no exclusiva c .

$$c = K_R / K_T$$

Si $c=0$, la única forma capaz de unir a S es R, si es ∞ la forma que preferencialmente une a S es T.

La cinética cooperativa, según este modelo, es el resultado de la interconversión de las formas. Los diversos ligandos de estas enzimas se unen de manera preferencial a alguna de las dos formas (sin que existan intermediarios entre las dos). El resultado de la unión es el desplazamiento del equilibrio hacia alguna de las dos formas, los activadores y sustratos se unen a la forma R y los inhibidores a la T. La fase de retardo (lag) en la cinética de la PFK-I con respecto a la fructosa 6-fosfato en bajas concentraciones ocurre porque una buena parte de la población de la enzima está en forma inactiva; la activación ocurre al aumentar la población de enzima activa inducido por el secuestro de la presente por el sustrato.

La constante de equilibrio (o constante de transición alostérica) entre las formas se designa L_0 y representa el valor intrínseco (en ausencia de ligandos) del cociente de las formas.

$$L_0 = T_0 / R_0$$

Con fines de ilustración en la figura A1 se muestra el esquema de la Transición Alostérica Concertada para una enzima tetramérica birreactante con un mecanismo cinético de reacción ordenado, en el mecanismo al azar se obtienen una mucho mayor cantidad de formas (véase ecuación 1,2 y 5). La constante de disociación de cada forma hacia los sustratos A y B se representa mediante la letra K y como subíndice la forma que une al

sustrato (T o R) y el sustrato unido (A o B). Por simplicidad, en esta sección sólo se ejemplificará la deducción de la ecuación de velocidad considerando un solo sustrato (S) y una sola constante de disociación (K_R y K_T), y posteriormente se anexará al otro sustrato y algunos efectores.

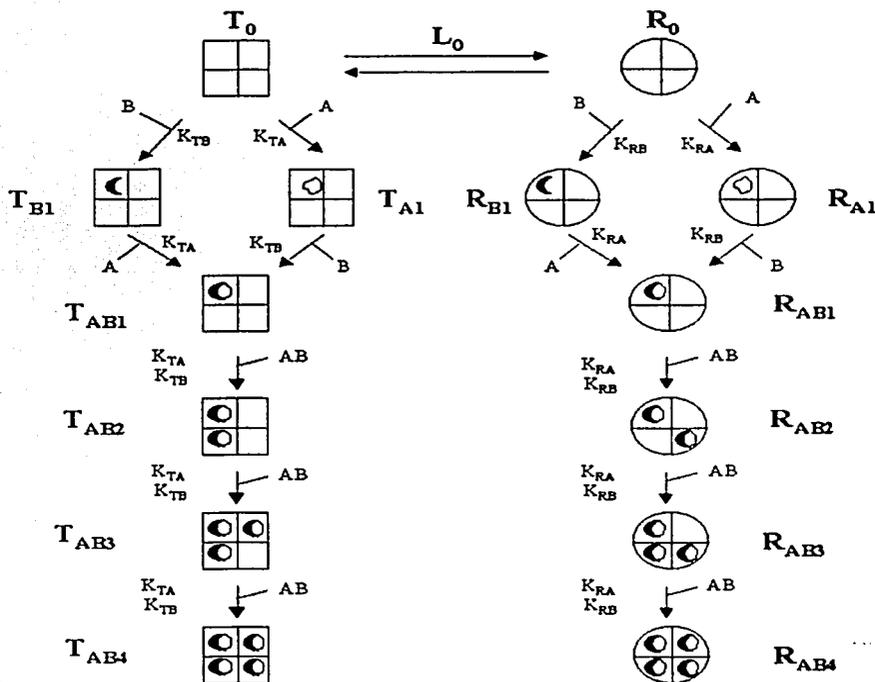


Figura A1. Esquema cinético de reacción para una enzima birreactante, que con fines de ilustración es ordenada.

En la tabla A1 se muestra la representación algebraica de las formas R en las diversas especies que surgen de unir a sólo uno de los dos sustratos. En la columna final se encuentra la representación de las formas en el caso de un tetrámero ($n=4$) simplificando al término (S/K_R) por α .

Forma	En términos de R_0		Cuando $n=4$	
R_0	R_0	R_0	R_0	R_0
R_1	$n (S/K_R) R_0$	$n (S/K_R) R_0$	$4 (S/K_R) R_0$	$4\alpha R_0$
R_2	$(n-1) (S/2K_R) R_1$	$n (n-1) (S^2/2K_R^2) R_0$	$6 (S^2/K_R^2) R_0$	$6\alpha^2 R_0$
R_3	$(n-2) (S/3K_R) R_2$	$n (n-1) (n-2) (S^3/6K_R^3) R_0$	$4 (S^3/K_R^3) R_0$	$4\alpha^3 R_0$
R_4	$(n-1) (S/4K_R) R_3$	$n (n-1) (n-2) (n-3) (S^4/24K_R^4) R_0$	$(S^4/K_R^4) R_0$	$\alpha^4 R_0$

Tabla A1. Representación y enumerado (columna 1) de las diversas especies de R, en términos de la forma inmediata anterior (columna 2), de R_0 (columna 3), cuando se trata de un tetrámero (columna 4) y simplificando por α ($\alpha=S/K_R$) (columna 5). S, cualquiera de los dos sustratos de la enzima; K_R , constante de disociación asociada a este ligando.

Forma	En términos de T_0		En términos de R_0	Cuando $n=4$	
T_0	T_0	T_0	L_0R_0	L_0R_0	L_0R_0
T_1	$n (S/K_T) T_0$	$n (S/K_T) T_0$	$Cn (S/K_R) LR_0$	$4c (S/K_R) L_0R_0$	$4c\alpha L_0R_0$
T_2	$(n-1) (S/2K_T) T_1$	$n (n-1) (S^2/2K_T^2) T_0$	$c^2n (n-1) (S^2/2K_R^2) LR_0$	$6c^2 (S^2/K_R^2) L_0R_0$	$6c^2\alpha^2 L_0R_0$
T_3	$(n-2) (S/3K_T) T_2$	$n (n-1) (n-2) (S^3/6K_T^3) T_0$	$c^3n (n-1) (n-2) (S^3/6K_R^3) LR_0$	$4c^3 (S^3/K_R^3) L_0R_0$	$4c^3\alpha^3 L_0R_0$
T_4	$(n-1) (S/4K_T) T_3$	$n (n-1) (n-2) (n-3) (S^4/24K_T^4) T_0$	$c^3n (n-1) (n-2) (n-3) (S^4/24K_R^4) LR_0$	$c^4 (S^4/K_R^4) L_0R_0$	$c^4\alpha^4 L_0R_0$

Tabla A2. Representación y enumerado (columna 1) de las diversas especies de T, en términos de la forma inmediata anterior (columna 2), de T_0 (columna 3), de R_0 (columna 4) cuando se trata de un tetrámero (columna 5) y simplificando por α ($\alpha=S/K_R$) (columna 6). S, cualquiera de los dos sustratos de la enzima; K_R , constante de disociación asociada a este ligando.

En la tabla A2 se presentan los equivalentes algebraicos de las formas T. En la columna 4 la equivalencia en términos de R_0 , lo cual resulta del siguiente despeje de T_0 y de K_T .

$$\begin{aligned} L_0 = T_0 / R_0 &\Rightarrow T_0 = L_0 R_0 \\ c = K_R / K_T &\Rightarrow K_T = K_R / c \end{aligned}$$

La velocidad de la reacción enzimática, según el esquema planteado en la figura A1, depende de una constante catalítica (k_p) y de la concentración del complejo ternario enzima-AB (EAB). Este complejo ternario a su vez es el resultado de la unión de ambos sustratos y en principio puede ser formado por ambas formas de la enzima en mayor o menor proporción. EAB es entonces el resultado del producto de las formas capaces de unir a cada sustrato (ecuación 1).

$$v = k_p EAB = k_p \left[\sum_{n=1}^4 R_n^A \right] \left[\sum_{n=1}^4 R_n^B \right] + k_p \left[\sum_{n=1}^4 T_n^A \right] \left[\sum_{n=1}^4 T_n^B \right] \dots\dots\dots (1)$$

Donde R_n^A , R_n^B , T_n^A y T_n^B representan la suma de las formas R o T uniendo a uno o mas de los dos sustratos A o B ($n=1-4$).

Al dividir ambos términos de la ecuación 1 por la enzima total (la suma incluye las especies que no unen sustrato, $n=0-4$) se obtiene la ecuación 2.

$$\frac{v}{E_t} = \frac{k_p \left[\sum_{n=1}^4 R_n^A \right] \left[\sum_{n=1}^4 R_n^B \right] + k_p \left[\sum_{n=1}^4 T_n^A \right] \left[\sum_{n=1}^4 T_n^B \right]}{\left[\sum_{n=0}^4 R_n^A \right] \left[\sum_{n=0}^4 R_n^B \right] + \left[\sum_{n=0}^4 T_n^A \right] \left[\sum_{n=0}^4 T_n^B \right]} \dots\dots\dots (2)$$

En la ecuación 3 y 4 se muestran dos ejemplos de cómo factorizar las dos ecuaciones en términos de $4kp\alpha R_0$, y R_0 , respectivamente. Este mismo procedimiento puede seguirse en el caso de las otras sumatorias, tomando en cuenta el valor de L_0 y de las constantes de enlazamiento no exclusivo para cada sustrato (c y d).

$$kp \left[\sum_{n=1}^4 R_n^A \right] = 4kp \alpha R_0 + 12kp \alpha^2 R_0 + 12kp \alpha^3 R_0 + 4kp \alpha^4 R_0 \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$= 4kp \alpha R_0 (1 + 3\alpha + 3\alpha^2 + \alpha^3)$$

$$\left[\sum_{n=0}^4 R_n^A \right] = R_0 + 4\alpha R_0 + 6\alpha^2 R_0 + 4\alpha^3 R_0 + \alpha^4 R_0 \quad \dots\dots\dots (4)$$

$$= R_0 (1 + 4\alpha + 6\alpha^2 + 4\alpha^3 + \alpha^4)$$

Sustituyendo los términos derivados de las ecuaciones 3 y 4 en la ecuación 2 se obtiene la ecuación 5.

(5)

$$v \text{ Et} = \frac{4kp \alpha R_0 (1 + 3\alpha + 3\alpha^2 + \alpha^3) + 4kp \beta R_0 (1 + 3\beta + 3\beta^2 + \beta^3) + 4kp c \alpha L_0 R_0 (1 + 3\alpha + 3\alpha^2 + \alpha^3) + 4kp d \beta L_0 R_0 (1 + 3\beta + 3\beta^2 + \beta^3)}{R_0 (1 + 4\alpha + 6\alpha^2 + 4\alpha^3 + \alpha^4) + R_0 (1 + 4\beta + 6\beta^2 + 4\beta^3 + \beta^4) + L_0 R_0 (1 + 4c\alpha + 6c^2\alpha^2 + 4c^3\alpha^3 + c^4\alpha^4) + L_0 R_0 (1 + 4d\beta + 6d^2\beta^2 + 4d^3\beta^3 + d^4\beta^4)}$$

En esta ecuación R_0 esta se encuentra en el denominador y numerador, y puede ser eliminado. En la ecuación 6 se define la V_m para este caso, y en las ecuaciones 7 y 8 se muestran dos ejemplos para factorizar los términos encerrados entre paréntesis de la ecuación 5.

$$4kp \text{ Et} = V_m \quad \dots\dots\dots (6)$$

$$1 + 3\alpha + 3\alpha^2 + \alpha^3 = \alpha (1 + \alpha)^3 \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$1 + 4\alpha + 6\alpha^2 + 4\alpha^3 + \alpha^4 = (1 + \alpha)^4 \quad \dots\dots\dots (8)$$

La forma de la ecuación después de realizar las factorizaciones y de sustituir términos se observa en la ecuación 9.

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\alpha (1 + \alpha)^3 \beta (1 + \beta)^3 + L_0 c \alpha (1 + c \alpha)^3 d \beta (1 + d \beta)^3}{(1 + \alpha)^4 (1 + \beta)^4 + L_0 (1 + c \alpha)^4 (1 + d \beta)^4} \quad (9)$$

Al reordenar los términos de esta ecuación de manera similar a la ecuación hiperbólica de Michaelis-Menten se llega a la ecuación general para una enzima birreactante al azar según el modelo de la Transición alostérica Concertada (ecuación 10).

$$v = \frac{V_m \alpha \beta (1 + \alpha)^3 (1 + \beta)^3 + L_0 c \alpha d \beta (1 + c \alpha)^3 (1 + d \beta)^3}{(1 + \alpha)^4 (1 + \beta)^4 + L_0 (1 + c \alpha)^4 (1 + d \beta)^4} \quad (10)$$

Como ya se ha mencionado los efectores alostéricos se unen selectivamente a las formas R o T de la enzima. Si se deduce la ecuación cuando se unen simultáneamente un activador y un inhibidor se llega a la ecuación 11. Nótese que los términos que describen a los inhibidores se asocian a L_0 puesto que aparecen como otra especie de T, y los activadores aparecen en el otro término del numerador o denominador que representa la suma de las formas R.

$$v = \frac{V_m \alpha \beta (1 + \alpha)^3 (1 + \beta)^3 \overbrace{(1 + \epsilon)^4}^{\text{Activador}} + L_0 c \alpha d \beta (1 + c \alpha)^3 (1 + d \beta)^3 \overbrace{(1 + \gamma)^4}^{\text{Inhibidor}}}{(1 + \alpha)^4 (1 + \beta)^4 \underbrace{(1 + \epsilon)^4}_{\text{Activador}} + L_0 (1 + c \alpha)^4 (1 + d \beta)^4 \underbrace{(1 + \gamma)^4}_{\text{Inhibidor}}} \quad (11)$$

Al dividir en ambos, numerador y denominador, por la expresión derivada de la unión del activador se llega a la ecuación 12, la cual es la ecuación general para una enzima birreactante capaz de unir a un activador y un inhibidor simultáneamente.

$$v = \frac{V_m \alpha \beta (1 + \alpha)^3 (1 + \beta)^3 + L_0 c \alpha d \beta (1 + c \alpha)^3 (1 + d \beta)^3 \frac{(1 + \gamma)^4}{(1 + \epsilon)^4}}{(1 + \alpha)^4 (1 + \beta)^4 + L_0 (1 + c \alpha)^4 (1 + d \beta)^4 \frac{(1 + \gamma)^4}{(1 + \epsilon)^4}} \quad (12)$$

Si se analiza el término asociado a L_0 de la ecuación 12 se puede entender el efecto de los activadores e inhibidores en la cinética de la enzima. Los inhibidores, al desplazar el equilibrio de las formas hacia T, incrementan el valor aparente de L y por lo tanto aparecen multiplicando a este factor; los activadores, al volver al valor aparente de L mas bajo, aparecen dividiendo.

El efecto de la unión independiente (que no comparten el mismo sitio de unión) de dos o mas efectores se ejemplifica en la ecuación 13. Si los dos efectores comparten un solo sitio de unión la expresión con la que se les representa es la ecuación 14.

$$L_0 \frac{(1 + \gamma)^4 (1 + \phi)^4}{(1 + \epsilon)^4 (1 + \lambda)^4} \quad (13)$$

$$(1 + \pi + \delta)^4 \quad (14)$$

La expresión algebraica derivada de la unión de una serie de efectores se resume en la ecuación 15.

$$L_0 \frac{(1 + \gamma)^4 (1 + \phi)^4}{(1 + \epsilon)^4 (1 + \lambda)^4 (1 + \varphi + \delta)^4} \quad (15)$$

La ecuación general para una enzima con n protómeros ampliada con las observaciones anteriores es:

(16)

$$v = \frac{V_m \alpha \beta (1 + \alpha)^{n-1} (1 + \beta)^{n-1} + L_0 c \alpha d \beta (1 + c\alpha)^{n-1} (1 + d\beta)^{n-1} \frac{(1 + \gamma)^n (1 + \phi)^n}{(1 + \epsilon)^n (1 + \lambda)^n (1 + \pi + \delta)^n}}{L_0 (1 + c\alpha)^n (1 + d\beta)^n \frac{(1 + \gamma)^n (1 + \phi)^n}{(1 + \epsilon)^n (1 + \lambda)^n (1 + \pi + \delta)^n} + (1 + \alpha)^n (1 + \beta)^n}$$

Por último, en el caso de la PFK I, que es una enzima tetramérica y que presenta unión exclusiva por uno de sus sustratos (fructosa 6-fosfato, término asociado β) se llega a la ecuación 17.

$$v = \frac{V_m \alpha \beta (1 + \alpha)^3 (1 + \beta)^3}{L_0 (1 + c\alpha)^4 \frac{(1 + \gamma)^4 (1 + \phi)^4}{(1 + \epsilon)^4 (1 + \lambda)^4 (1 + \pi + \delta)^4} + (1 + \alpha)^4 (1 + \beta)^4} \dots \dots \dots (17)$$

BIBLIOGRAFÍA

- Arora, K. K., Pedersen P.L. (1988) Functional significance of mitochondrial bound Hexokinase in tumor cell metabolism. *J. Biol. Chem.* 263 : 17422-17428.
- Au, K.K., Liang, E., Li, Y.P., Liew, C.C. Kwok, T.T., Choy, Y.M., Lee, C.Y., Fung, K.P. (1997) Increases in mRNA levels of Glucose Transporter types 1 and 3 in Ehrlich ascites tumor cells during tumor development. *J. Cell. Biochem.* 67: 131-135.
- Baggeto, L.G. (1992) Deviant Energetic Metabolism of Glycolytic Cancer Cells. *Biochimie.* 74: 959-974.
- Baggeto, L.G., Lehninger, A.L. (1987) Formation and utilization of Acetoin, an unusual product of pyruvate metabolism by Ehrlich and AS-30D tumor mitochondria. *J. Biol. Chem.* 262: 9535-9541.
- Baggeto, L.G., Testa-Parussini, R. (1990) Role of Acetoin on the regulation of intermediate metabolism of Ehrlich ascites tumor mitochondria: Its contribution to membrane cholesterol enrichment modifying passive proton permeability. *Arch. Biochem. Biophys.* 283: 241-248.
- Bagui, S., Ray, M., Ray, S. (1999) Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase from Ehrlich ascites carcinoma cells. *Eur. J. Biochem.* 262: 386-395.
- Barker, J., Khan, M.A.A., Solomos, T. (1966) Mechanism of the Pasteur Effect *Science.* 211: 547-548.
- Becker, S., Schneider, F. (1989) Investigations on the function of Creatine Kinase in Ehrlich ascites tumor cells. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 370: 357-364.
- Bergmeyer, H.U. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., Ed) Vols 3-9, Weinheim, Verlag Chemie.
- Birnbaum, M.J., Haspel, H.C., Rosen, O. M. (1987) Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases Glucose Transporter gene expression. *Science.* 235: 1495-1498.
- Blangy, D., Buc, H., Monod, J. (1968) Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase form *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 31: 13-35.
- Bloxham, D.P., Lardy, H. (1973) Phosphofructokinase. *En: The enzymes* (Boyer, P.D. Ed), Vol. 2, p. 239-278, New York, Academic Press.
- Boscá, L., Aragón, J.J., Sols, A. (1982) Specific activation by fructose 2,6-bisphosphate and inhibition by P-enolpyruvate of ascites tumor Phosphofructokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106: 486-491.
- Boscá, L., Corredor, C. (1984) Is Phosphofructokinase the rate-limiting step of glycolysis. *Trends Biochem. Sci.* 9: 372-373.
- Bossi, D., Wolf, F.I., Calviello, G., Cittadini, A. (1989) The effect of Mg²⁺ upon 6-phosphofructokinase activity in Ehrlich ascites tumor cells *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* 275: 174-180.
- Boxer, G.E., Devlin, T.M. (1961) Pathways of intracellular hydrogen transport. *Science.* 134: 1495-1497
- Briscoe, D.A., Fiskum, G., Holleran, A.L., Kelleher, J.K. (1994). Acetoacetate metabolism in AS-30D hepatoma cells. *Moll. Cell. Biochem.* 136: 131-137.

- Bustamante, E., Pedersen, P.L. (1977) High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial Hexokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 3735-3739.
- Capuano, F., Guerrieri, F., Papa, S. (1997) Oxidative phosphorylation enzymes in normal and neoplastic cell growth. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 379-384.
- Cuezva, J. M., Ostronoff, L.K., Ricart, J., López de H., M., Di Ligerio, C. M., Izquierdo, J. M. (1997) Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 365-377.
- Dang, C.V., Lewis, B. C., Dolde, C., Dang, G., Shim, H. (1997) Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis. *J. Bioenerg Biomembr.* **29**: 345-354.
- Dang, C.V., Semenza, G.J. (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 68-72.
- Dell'Antone, P. (1994) Metabolic pathways in Ehrlich ascites tumor cells recovering from a low bioenergetic status. *FEBS Lett.* **350**: 183-186.
- Dietzen, D.J., Davies, E.J. (1993) Oxidation of pyruvate, malate, citrate and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**: 91-102.
- Dills, W.L. (1993) Nutritional consequences of tumour glycolysis. *Parasitol.* **107**: S177-S186.
- Dionisi, T., Longhi, G., Eboli, M.L., Galeotti, T., Terranova, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta.* **333**: 577-580.
- Dunaway, G.A. (1983) A review of animal Phosphofructokinase isozymes with an emphasis on their physiological role. *Moll. Cell. Biochem.* **52**: 75-91.
- Dunaway, G.A., Naqui, D., Kruep, D., Thrasher, J.R., Morris, H.P. (1981) Phosphofructokinase isozymes of Morris hepatomas. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**: 1-8
- Eboli, M.L., Paradies, G., Galeotti, T., Papa, S. (1977) Pyruvate transport in tumor cell mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **460**: 183-187.
- Eigenbrodt, E., Fister, P., Reinacher, M. (1985) New perspectives in carbohydrate metabolism in tumor cells. *In: Reitner, R. (ed). Regulation of carbohydrate metabolism.* Boca Raton, Florida: CRC Press. **2**: 141-179.
- Flier, J. S., Mueckler, M.M., Usher, P., Lodish, H.F. (1987) Elevated levels of Glucose Transport and Transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science.* **235**: 1495-1498.
- Fung, K.P., Choy, Y.M., Chan T.W., Lam, W.P., Lee, C.Y. (1986) Glucose regulates its own transport in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Res Comm.* **134**: 1231-1237.
- Goldhammer, A.R., Hammes, G.G. (1978) Steady-state kinetic study of rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochem.* **17**: 1818-1821.
- Golshani-Hebroni, S.G., Bessman, S.P. (1997) Hexokinase binding to mitochondria: A basis for proliferative energy metabolism. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 331-338.
- González-Mateos, F., Gómez, M. García-Salguero, L., Sánchez, V., Aragón J.J. (1993) Inhibition of glycolysis by aminoacids in ascites tumor cells. Specificity and Mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**: 7809-7817.

- Greenhouse, W.V.V., Lehninger, A. (1976) Magnitude of malate-aspartate reduced nicotinamide adenine dinucleotide shuttle in intact respiring tumor cells. *Cancer Res.* 37: 4173-4181.
- Greenhouse, W.V.V., Lehninger, A. (1977) Occurrence of Malate -Aspartate Shuttle in various tumor cells. *Cancer Res.* 36: 1392-1396
- Grivell, A. R., Koperlainen, E. I., Williams, C. J., Berry, M. N. (1995) Substrate-dependent utilization of the Glycerol 3-phosphate or Malate/ Aspartate redox shuttles by Ehrlich ascites cells. *Biochem. J.* 310: 665-671.
- Hawkins, R.D., Kalant, H. (1972) The metabolism of ethanol and its metabolic effects. *Pharmacol. Rev.* 24: 67-157.
- Hue, L., Rider, M.H. (1987) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* 245: 313-324.
- Hue, L., Rousseau, G.G. (1993) Fructose 2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by growth factors, tumor promoters and oncogenes. *Adv. Enz. Regul.* 97-110.
- Jannaschk, D., Burgos, M., Centerlles, J.J., Ovadi, J., Cascante, M. (1999) *FEBS Lett.* 445: 144-148.
- Jucker, B.M., Barucci, N., Shulman, G.L. (1999) *Am. J. Physiol.* 277: E505-E512
- Kashiwaya, Y., Sato, K., Tsuchiya, N., Thomas, S., Fell, D.A., Veech, R. L., Passonneau, J.V. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 25502-25514.
- Kelleher, JK, Bryan, B. S., Mallet, R.T., Holleran, A.L. (1987) Analysis of tricarboxilic acid-cycle metabolism of hepatoma cells by comparison of ¹⁴CO₂ ratios. *Biochem. J.* 246: 633-639.
- Kemp, R.G., Foe, L.G. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* 57: 147-154.
- Knox, W.E., Jamdar, S.C., Davis, P.A. (1970) Hexokinase, differentiation and growth rates of transplanted rat tumors. *Cancer Res.* 30: 2240-2244.
- Kole, H.K., Resnick, R.J., van Doren, M., Racker, E. (1991) Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in *ras*-transformed fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 286: 586-590.
- Koobs, D.H. (1972) Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science.* 178: 127-133.
- Kovacevic, Z. (1972) Possibility for the transfer of NADH from the cytosol to the mitochondrial compartment in Ehrlich ascites tumor cells. *Eur. J. Biochem.* 25: 372-378.
- Kovacevic, Z., Brkljac, O., Jerance, D. (1991) Mechanism and control of degradation and resynthesis of adenylates in tumour cells. *Biochem. J.* 273: 277-281.
- Lagunas, R., Gancedo, C (1983) Role of phosphate in the regulation of Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 137:479-483.
- Layzer, R.B., Rowland, L.P., Bank, W.J. (1969) Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 244:3823-31.
- Lin, E. C. C. (1977) Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 765-795.
- López-Gómez, F.J., Torres-Márquez, M.E., Moreno-Sánchez, R. (1993) *Int J Biochem.* 25: 373-377.

- Mansour, T.E. (1972) Phosphofructokinase. *En: Curr. Tops. Cell. Regul.* (Horecker, B.L. and Standman, E.R., Eds.). Vol. 5. p 1-46, New York, Academic Press.
- Meldolesi, M., Macchia, V., Laccetti, P. (1976) Differences in Phosphofructokinase regulation in normal and tumor rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.* 251: 6244-6251.
- Molina, B. (1996) Cultivo de tejidos. *In: González-Morán, M. (Ed). Técnicas en Biología Celular.* AGT. México.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Zavala, J.S., Castillo, A., Rodríguez-Enríquez, Bravo, C. (1997) Control fisiológico de la fosforilación oxidativa. Avances recientes. *En: Pardo, J.P., Juárez, M.A., Morales, S., Martínez, F. (Eds. Juárez, M.A., Martínez, F., Pardo J.P.) Mensaje Bioquímico. Fac. Med., UNAM, Vol XXI, p. 45-109*
- Nakano, M., Funayama, S., De Oliveira, M. B. M. (1992) Glycerlaldehyde 3-phosphate Dehydrogenase from HeLa cells - 1. Purification and properties of the enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 873-877
- Nakashima, R.A., Paggi, M. G., Arora, K. K., Pedersen P.L. (1991) Integration of mitochondrial function with high aerobic glycolysis in tumors: Role of Hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 17418-17428.
- Nakashima, R.A., Paggi, M. G., Scott, L.J., Pedersen P.L. (1988) Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound Hexokinase from the high glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. *Cancer Res.* 48: 913-919.
- Nakashima, R.A., Paggi, M.G., Pedersen, P.L. (1984) *Cancer Res.* 44: 5702-5706.
- Newsholme, E.A., Start, C. (1973) *Regulation in Metabolism*, Wiley and Sons, New York.
- Oskam, R., Rijkssen, G., Staal, G.E.J., Vora, S., (1985) Isozymic composition and regulatory properties of Phosphofructokinase from well-differentiated and anaplastic medullary thyroid carcinomas of the rat. *Cancer Res.* 45: 135-142.
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A. Dang, C.V. (2000) Deregulation of Glucose Transporter 1and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275(29): 21797-21800.
- Página electrónica de la American Type Culture Collection (ATCC) <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/c1179.html>
- Paradies, G., Capuano, F., Palombini, G., Galeotti, T., Papa, S. (1983) Transport of pyruvate in mitochondria from different tumor cells. *Cancer Res.* 43: 5068-5071.
- Parlo, R.A., Coleman, P.S. (1984) Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* 259: 9997-10003.
- Parry, D.M., Pedersen, P.L. (1983) Intracellular localization and properties of particulate Hexokinase in the Novikoff ascites tumor. *Journal of Biol Chem.* 258: 10904-10912.
- Pedersen, P.L. (1978) Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor Rev.* 22: 190-274
- Puigjaner, J., Rais, B., Burgos, M., Comin, B., Ovadi, J., Cascante, M. (1997) *FEBS lett.* 418: 47-52.
- Racker, E., Spector, M. (1981) Warbug effect revisited: Merger of biochemistry and molecular biology. *Science.* 213: 303-307

- Ramanaiah, A (1974) Pasteur Effect and Phosphofructokinase. *Curr. Top. Cell. Regul.* 8: 297-345.
- Reibstein, J.A., den Hollander, S., Pilkis, S.J., Shulman, R.G. (1986) Studies on the regulation of yeast phosphofructo-1-kinase: Its role in aerobic and anaerobic glycolysis. *Biochem.* 25: 219-227.
- Reinhart, G.D. (1980) Rat liver Phosphofructokinase: Kinetic activity under near physiological conditions. *Biochemistry.* 19: 1477-1484.
- Reitzer, L.J., Wice, B.M., Kennel, D. (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254(8): 2669-2676
- Rodríguez, S., Torres-Márquez, M.E., Moreno-Sánchez, R. (2000) Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 375(1): 21-30.
- Rodríguez, S., Juárez, O., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R. (2001) Multisite control of Crabtree effect in ascites tumor cell. *Eur. J. Biochem.* 268 : 2512-2519.
- Sánchez-Jimenez, F., Martínez, P., Núñez de Castro, I., Olavarria, J.S. (1985) The function of redox shuttles during aerobic glycolysis in two strains of Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimie* 67: 259-264.
- Sánchez-Martínez, C., Aragón, J.J. (1997) Analysis of Phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, mammary gland. *FEBS Lett.* 409: 86-90.
- Sánchez-Martínez, C., Estévez, A., Aragón, J.J. (2000) Phosphofructokinase C isozyme from ascites tumor cells: cloning, expression, and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 635-640.
- Schmidt, H., Siems, W., Müller, M., Dumdey, R., Rapoport, S.M. (1991) *Exper Cell Res.* 194: 122-127.
- Scilowski, P.W.D., Slominski, A., Bomirski, A. (1984) Biochemical characterization of three hamster melanoma variants-II. Glycolysis and oxygen consumption. *Int. J. Biochem.* 16: 327-331.
- Segel, I. H. (1975) Enzyme kinetics. Behavior and analysis rapid equilibrium and steady-state systems. John Wiley and Sons.
- Semenza, G.J. (1998) Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 8: 588-594.
- Siesjo, B.K., Katsura, K.I., Ksritian, T., Li P.A. y Siesjo, P. (1996) Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta. Neurochim. Suppl (Wien).* 66: 8-14.
- Smith, D.F., Walborg, E.F., Chang, J. (1970) Establishment of a transplantable ascites variant of a rat hepatoma induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 30: 2306-2309.
- Staal, G.E.J., Kalff, A., Heesbeen, E.C., van Veelen, C.W.M., Rijkshoven, G. (1987) Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of Phosphofructokinase from human gliomas. *Cancer Res.* 47: 5047-5051.
- Stellwagen, E., Wilgus, H. (1975) Phosphofructokinase of yeast. *Methods Enzymol.* 42:78-85
- Stubbs, M., Rodríguez, L., Howe, F.A., Wang, J., Jeong, K., Veech, R.L., Griffiths, J.R. (1994) Metabolic consequences of a reversed pH gradient in rat tumors. *Cancer Res.* 54: 4011-4016.

- Sumi, T., Ui, M. (1972) Purification and some properties of phosphofructokinase from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 268: 354-363.
- Sumner, J.B. (1964) A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science.* 100: 413-414.
- Sussman, I., Erecinska, M., Wilson, D.F. (1980) Regulation of cellular energy metabolism: The Crabtree effect. *Biochim. Biophys. Acta.* 591: 209-223.
- Suzuki, R., Sato, K., Tsuiki, S. (1968) Pyruvate inhibition of glycolysis in Ehrlich ascites tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 124: 596-603.
- Sweeney, M.J., Ashmore, J., Morris, H.P., Weber, G. (1963) Comparative biochemistry of hepatomas. IV Isotope studies of glucose and fructose metabolism in liver tumors of different growth rates. *Cancer Res.* 23: 995-1002.
- Tewjani, G.A. (1978) The role of phosphofructokinase in the Pasteur Effect. *Trends Biochem. Sci.* 3: 30-33.
- Traut, T.W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* 140: 1-22.
- Ui, M., Sumi, T. (1982) Phosphofructokinase from Ehrlich ascites tumor. *Methods Enzymol.* 90: 35-38.
- Uyeda, K. (1990) Phosphofructokinase and fructose 6-phosphate, 2-kinase: fructose 2,6-bisphosphatase. *In A study of enzymes.* Vol II. (Kuby, S.A. Ed) CRC Press.
- Vora, S., Halper, J.P., Knowles, D.M. (1985) Alterations in the activity and isozymic profile of human Phosphofructokinase during malignant transformation *in vivo* and *in vitro*: Transformation -and progression- linked discriminants. *Cancer Res.* 45: 2993-3001.
- Weber, G. (1977). *Enzymology of cancer cells (First Part).* New Engl. Jour. Med. 296 : 486-493.
- Weber, G. (1977). *Enzymology of cancer cells (Second Part).* New Engl. Jour. Med. 296 (10): 541-551.
- Woldegiorgis, G., Shrago, E. (1985) Adenine nucleotide translocase activity and sensitivity to inhibitors in hepatomas. *J. Biol. Chem.* 260 (12): 7585-7590.
- Woods, H.F., Krebs, H.A. (1973) The effect of glycerol and dihydroxyacetone on hepatic adenine nucleotides. *Biochem. J.* 132: 55-60.
- Wu, R. (1966) Further analysis of the mode of inhibition and activation of Novikoff ascites Phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 241: 4680-4685.
- Yoshino, M., Murakami, K. (1983) Role of AMP deaminase in the response of phosphofructokinase to the adenylate energy charge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 96-101.