



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CONTROL DE LA GLUCÓLISIS EN LAS CÉLULAS
TUMORALES HUMANAS DE CÁNCER CERVICO-
UTERINO y PRÓSTATA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

BRENDA PAOLA PIÑONEZ CRUZ



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. José Pedraza Chaverri.

VOCAL: Dr. Rosario Adelaida Muñoz Clares.

SECRETARIO: M. en C. Álvaro Marín Hernández.

1er. SUPLENTE: Profra. Perla Deyanira Maldonado.

2° SUPLENTE: Profra. Vanessa Maya Ampudia.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

ASESOR:

M. en C. Álvaro Marín Hernández.

SUSTENTANTE:

Brenda Paola Piñonez Cruz.

I. RESUMEN

Las células tumorales se distinguen por poseer un incremento en su metabolismo glucolítico con respecto a las células no tumorales. Esta característica les confiere una ventaja selectiva para poder sobrevivir en un medio donde el oxígeno es limitado.

La glucólisis en las células normales se controla principalmente por dos enzimas la hexocinasa (HK) y la fosfofructo cinasa tipo 1 (PFK-I). En estudios recientes se demostró que en las células tumorales de rata hepatoma AS-30D, el control es ejercido por el transportador de glucosa (GLUT) y la HK.

Con el fin de poder establecer si en las líneas tumorales humanas se controla la glucólisis la misma manera que en el hepatoma de rata, en el presente trabajo se caracterizó cinéticamente cada una de las enzimas involucradas en la vía glucolítica en células tumorales humanas de cáncer cérvico-uterino (HeLa) y de cáncer de próstata (PC-3), determinando sus parámetros cinéticos (V_{max} y K_m). A su vez, se evaluó el efecto inhibitorio de la glucosa-6-fosfato (G6P) sobre la HK así como el efecto activador de la F-2,6-BP sobre la PFK-I.

A partir de los resultados obtenidos podemos proponer que en las células tumorales humanas el GLUT y la HK pueden ser los principales puntos de control de la glucólisis. Esto debido a que el GLUT mantiene la V_{max} menor con respecto a las enzimas glucolíticas ya que la HK es inhibida fuertemente por la G6P. Sin

embargo, aun faltan estudios más detallados para poder determinar el porcentaje con que contribuye cada enzima en el control del flujo de la glucólisis.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CÁNCER

El cáncer es un trastorno en los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación en las células eucarióticas superiores. Existe un tiempo de vida determinado de cada organismo, y por tanto de sus células, en donde los procesos de crecimiento y división están controlados; sin embargo en las células tumorales dichos controles no se cumplen (Figura 1) (Torroella y Villa, 1998)

Las células normales y las células tumorales presentan características distintas y bien definidas, las cuales se resumen en la Tabla 1.

DIVISIÓN CELULAR

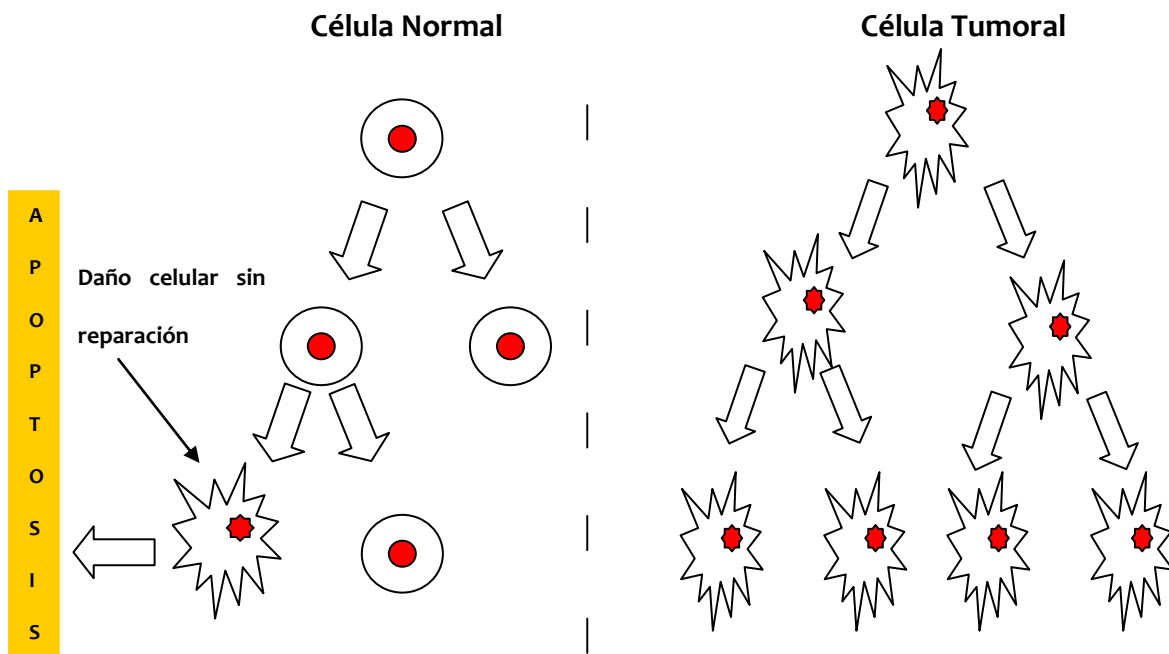


Figura 1. En las células normales, una célula con daño celular al no poderse reparar es canalizada directamente a apoptosis; en cambio en las células cancerosas este mecanismo no está presente y la célula con daño celular (anormal) se sigue dividiendo descontroladamente.

Tabla 1. Características de las células normales y de las células tumorales

Células Normales	Células Tumorales
Respetan una división de funciones dentro del tejido	No respetan la división de funciones en el tejido.
Tienen un tiempo de vida limitado.	Tienen un tiempo de vida ilimitado
Presentan inhibición al contacto.	Hay pérdida de la inhibición por contacto
Presentan proliferación controlada	La proliferación celular es descontrolada
Poseen citoesqueleto con una organización determinada.	Pérdida de la organización.
Uso de vías convencionales en la producción de energía (Mitocondria)	Uso de vías anaerobias en la generación de energía (Fermentación)

Datos tomados de Torroella y Villa (1998); Romero Lira (2000).

Por su origen histológico los cánceres pueden clasificarse en:

1. Carcinomas: Son los más frecuentes y se derivan de la malignización de epitelios.
2. Sarcomas: Son el resultado de la transformación maligna de células de tejidos conectivos o de sostén.
3. Leucemias y linfomas: Son malignizaciones de células hematopoyéticas.

2.2 EL CÁNCER EN MÉXICO

En el 2006 los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en México; 63, 888 personas fallecieron por éstos, el volumen representa 12.9% del total de las

defunciones registradas (INEGI, 2008). En las mujeres, 13.9% de las defunciones por cáncer maligno corresponden al cérvico-uterino y 15% más al de mama; asimismo, el de hígado y vías biliares intrahepáticas ocasionó 9.2% de las muertes (Figura 2). En los hombres existen tres tipos de tumores malignos que son la causa principal de muerte: tumores en aparato respiratorio, tumores de *próstata* y tumores de estómago, siendo los de mayor incidencia los tumores de próstata con 17.1%, los de tráquea, bronquios y pulmón con un 16.6% y por último los de estómago con 10.4% (Figura 2).

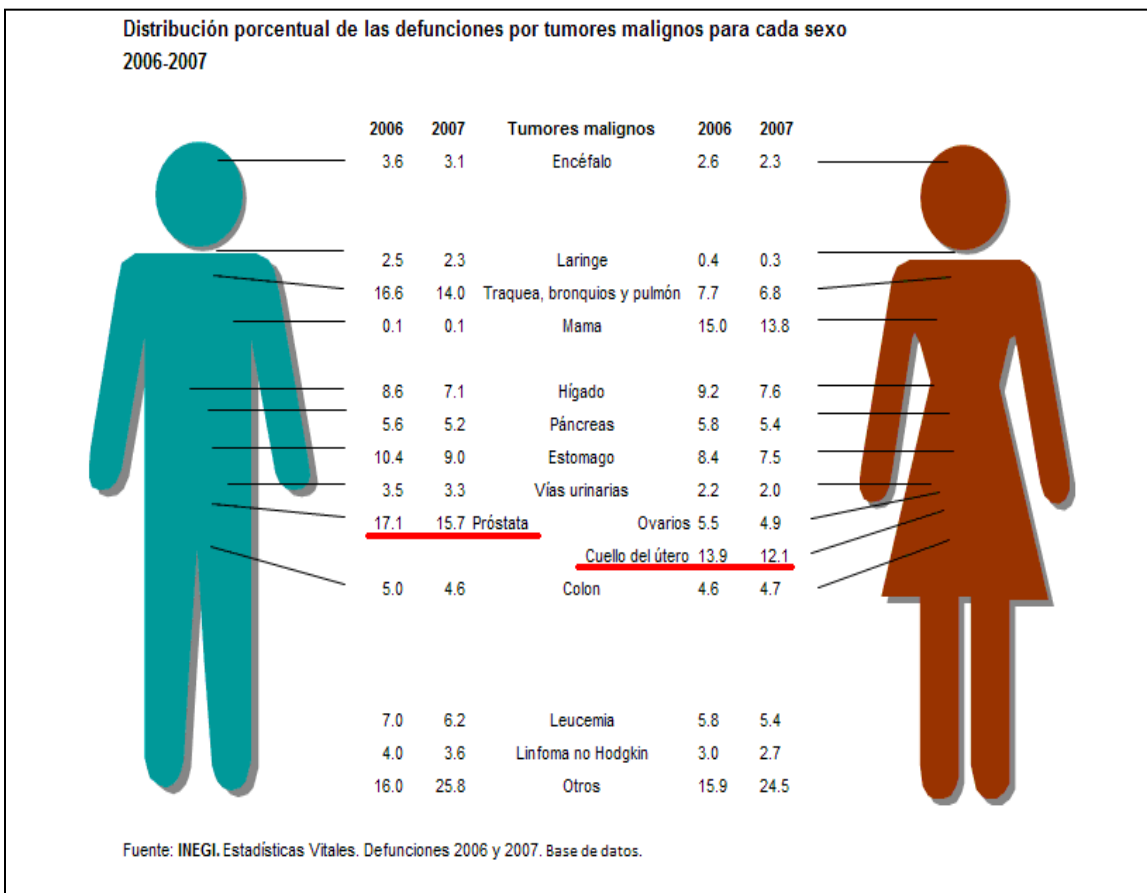


Figura 2. Incidencia del cáncer en México en el 2007. Fuente INEGI, 2008. En esta figura se muestra la distribución porcentual por sexo de los diferentes tipos de cáncer.

2.3 CANCER CÉRVICO-UTERINO

El cáncer cérvico-uterino es el más frecuente en las mujeres, representa más del 24% de todas las neoplasias malignas reportadas en México, siendo esta neoplasia uno de los problemas de salud más graves en México (INEGI, 2008).

Este tipo de cáncer se sitúa en la porción inferior y estrecha del útero que desemboca en la vagina (cérvix uterino). Empieza creciendo lentamente, los tejidos pasan por un proceso (displasia) en el cual empiezan a aparecer células anormales, lo cual se diagnosticará por una citología con tinción de Papanicolaou donde se encuentran células pre-malignas; posteriormente las células cancerosas empiezan a crecer y se diseminan con mayor profundidad en el cuello uterino y tejidos circundantes (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos CancerNet en <http://cancernet.nci.nih.gov>).

El cáncer cérvico-uterino puede ser clasificado en las siguientes etapas:

- ◆ *Estadio 0 o carcinoma in situ*: Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino y no invaden los tejidos más profundos del cuello uterino.
- ◆ *Estadio I*. El cáncer afecta el cuello uterino.
- ◆ *Estadio II*. Existe diseminación pero aún se encuentra en la región pélvica.
- ◆ *Estadio III*. La diseminación ha llegado a toda la región pélvica. Las células cancerosas pueden haberse diseminado a la parte inferior de la

vagina. Las células también pueden haberse diseminado para bloquear los tubos que conectan los riñones a la vejiga (los uréteres).

- ◆ **Estadio IV.** El cáncer está presente en otras partes del cuerpo (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos CancerNet en <http://cancer.net.nci.nih.gov>).

2.4 CANCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata es el más común en los hombres de edad avanzada, con mayor frecuencia a partir de los 60 años. Se diagnostica por medio de tres procedimientos: tacto rectal, antígeno prostático específico (PSA) y punción/biopsia de próstata.

Éste está constituido por el desarrollo de células indiferenciadas denominadas malignas dentro de la próstata, generalmente en la región posterior cerca del recto, aunque en etapas avanzadas se pueden encontrar fuera de ella como en huesos y ganglios linfáticos.

Existen cuatro estadios en los que se puede clasificar el cáncer de próstata en base a los cuales se determina la gravedad de la enfermedad y por tanto el tratamiento a seguir.

- ◆ **Estadio I.** El cáncer está localizado sólo en la próstata.
- ◆ **Estadio II.** Es más avanzado, pero no se ha diseminado fuera de la próstata.

- ◆ **Estadio III.** Se ha diseminado fuera de la próstata. Se puede encontrar en las vesículas seminales, pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos.
- ◆ **Estadio IV.** Puede estar en los músculos u órganos vecinos. Se puede haber diseminado a los ganglios linfáticos. Es posible que se haya diseminado a otras partes del cuerpo (National Cancer Institute, <http://www.cancer.gov>).

2.5 METABOLISMO ENERGÉTICO DE LAS CÉLULAS TUMORALES

2.5.1 Glucólisis

La glucólisis es la secuencia de 10 reacciones enzimáticas que convierte la glucosa en piruvato (PYR) con la producción de ATP (2 moles de ATP por cada mol de glucosa GLU). La glucólisis desempeña un papel importante en el metabolismo energético pues proporciona una parte muy importante de energía utilizada por el organismo; además de convertir la glucosa en piruvato para que pueda ser empleada en la degradación oxidativa (ciclo de Krebs) donde existe una mayor producción de ATP (32 por mol de glucosa) y por consiguiente mayor energía (Stryer, 1993).

En una vía metabólica la concentración de intermediarios se mantiene constante, debido a que, las velocidades de síntesis y degradación son similares; estas concentraciones y el nivel del flujo metabólico en el que se mantiene la vía pueden variar dependiendo de las necesidades del organismo. Esto ocurre a través de un sistema de controles precisos y muy sensibles; en el caso de la glucólisis dicho

control es ejercido por dos enzimas de la vía: la hexocinasa (HK) y la fosfofructoquinasa tipo I (PFK-I), ya que la HK es inhibida por su producto G6P y la PFK-I es estimulada alostéricamente por F-2,6B-P e inhibida por ATP y citrato (Voet, 1990). Bajo condiciones aeróbicas, en muchas células de mamífero, la glucólisis se inhibe por la presencia de oxígeno que permite a las mitocondrias oxidar el piruvato a CO_2 y H_2O , este fenómeno se conoce con el nombre de efecto Pasteur. Si el suministro de oxígeno es insuficiente, el piruvato se convierte en lactato (Figura 3) (Racke, 1974; Samenza et al. 2001; Gatenby y Gillies, 2004).

En general las células tumorales tienen como alteración más notoria un incremento en la capacidad glucolítica. En estas células, el efecto Pasteur se pierde, en cambio se observa el “efecto Warburg” en el cual se incrementa la glucólisis aeróbica, es decir, la conversión de glucosa a ácido láctico en presencia de oxígeno (Racker, 1974; Samenza, 2001; Gatenby y Gillies, 2004).

Este incremento en el flujo glucolítico puede favorecer la proliferación de las células tumorales sobre las células normales en un medio ácido confiriéndoles así una ventaja selectiva e incrementando su supervivencia en un medio con bajas concentraciones de oxígeno (Mazurek et al., 1997, Gatenby y Gillies 2004; Marín et al., 2006 y Moreno et al., 2007). Además el aumento en la glucólisis es una forma de respuesta de las células tumorales para suplir el aumento en la demanda de energía en forma de ATP para llevar a cabo su proliferación (Moreno et al 2007). Se ha reportado que hay líneas tumorales en las que la glucólisis suministra del 50% al 70% del requerimiento de ATP (energía) (Warburg, 1956),

sin embargo hay reportes de otras líneas tumorales en donde la glucólisis sólo aporta un 10% de este suministro de ATP (Zu y Guppy, 2004) ya que la fosforilación oxidativa suministra la mayor parte de la energía.

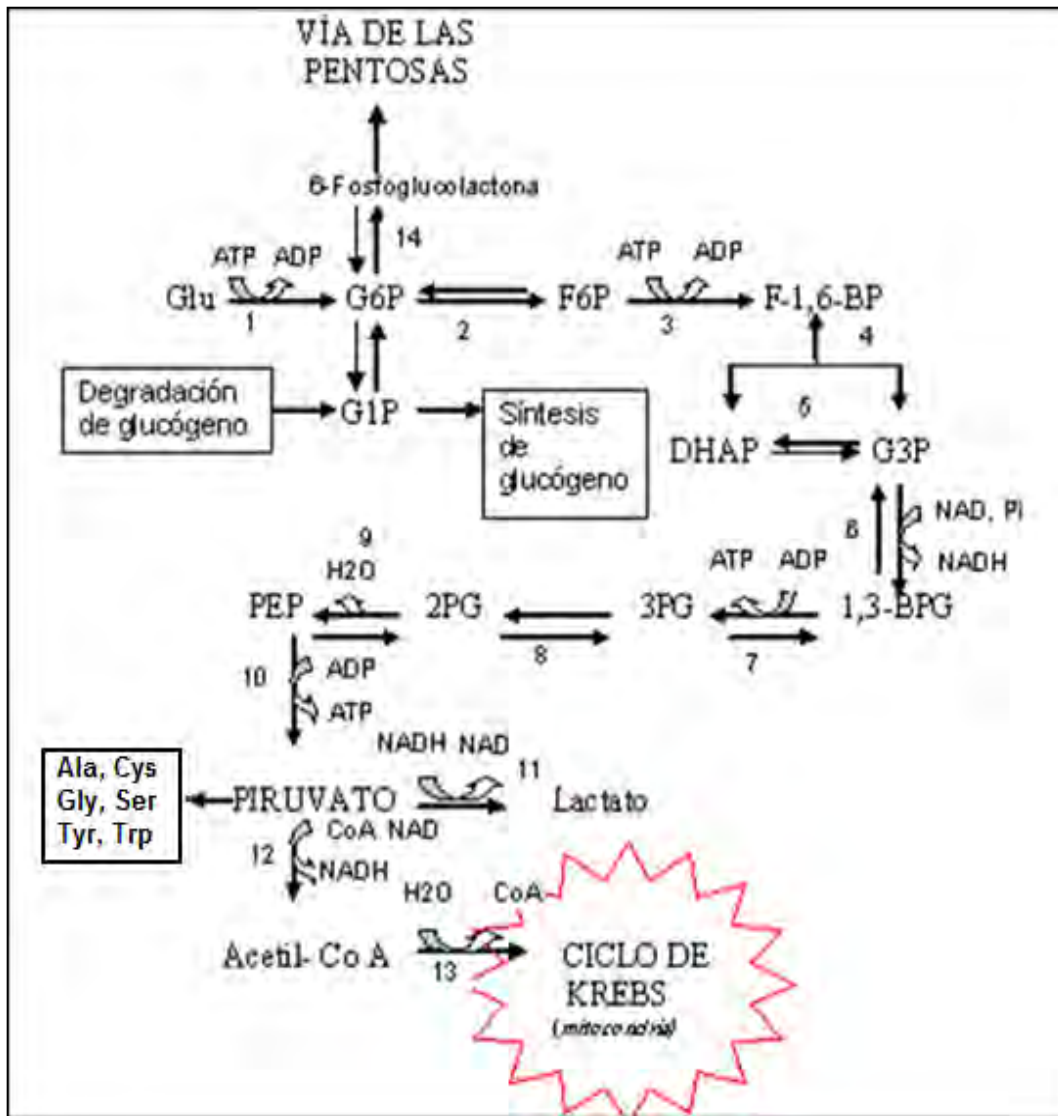


Fig. 3. Glucólisis. Reacciones enzimáticas de la vía y algunas de sus ramificaciones. 1. Hexocinasa (HK); 2. Hexosa fosfato isomerasa (HPI); 3. Fosfofructocinasa tipo I (PFK-1); 4. Aldolasa (ALD); 5. Triosa fosfato isomerasa (TPI); 6. Gliceraldehído-3-Pdeshidrogenasa (G3PDH); 7. Fosfoglicerato cinasa (PGK); 8. Fosfoglicerato mutasa (PGM); 9. Enolasa (ENO); 10. Piruvato cinasa

(PK); 11. Lactato deshidrogenasa (LDH); 12. Piruvato deshidrogenasa (PYDH); 13. Citrato sintasa; 14. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

El persistente incremento de la fermentación láctica tiene como resultado un incremento significativo en la acidez local del microambiente con valores hasta de pH 6.0 en tumores de animales y humanos (Raghunand et al 2004; Gillies et al 2002). Las células normales no son capaces de sobrevivir en este ambiente ácido pues no cuentan con los mecanismos de adaptación necesarios para resistir la acidosis extracelular (Raghunand et al. 2004; Morita et al. 1992).

El fenotipo glucolítico se desarrolla en microambientes que son avasculares, es decir, las células están envueltas físicamente y separadas del suministro de oxígeno por una membrana (en tumores in situ); lo cual promueve la difusión de sustratos para que pueda llevarse a cabo la proliferación del epitelio tumoral. El carcinoma in situ en su último estadio se caracteriza por ser angiogénico.

Además el fenotipo glucolítico en las células puede ser importante para la metástasis ya que la regulación glucolítica incrementa la concentración intratumoral de lactato lo cual ha sido asociado con un incremento en la metástasis en cáncer cérvico-uterino. Durante el proceso de metástasis, las células migran e invaden el estroma a lo largo de las arteriolas, capilares y precapilares. Estas células experimentan posiblemente periodos en donde la concentración de oxígeno es muy baja o bien carecen de este en su proliferación; por lo cual el estado final de la secuencia metastásica favorece que las células

sean glucolíticas y resistentes a la hipoxia o apoptosis inducida por la acidez confiriéndoles una ventaja selectiva.

2.5.2 Mecanismos que inducen el incremento en la velocidad de glucólisis

EL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF-1)

HIF-1 es un factor de transcripción que está constituido por dos subunidades: HIF-1 α y HIF-1 β (Moreno et al., 2007). El HIF-1 regula la expresión de 70 genes cuyos productos están implicados en la respuesta celular a la hipoxia, entre los que se encuentran factores de crecimiento, factores angiogénicos y factores hematopoyéticos (Marie et al. 2006). HIF-1 favorece el incremento del flujo glucolítico ya que promueve la expresión de los genes que codifican para cada una de las enzimas de la vía glucolítica: HK, PFK-I, PFK-2, ALD, GAPDH, PGK, ENO, PK, y LDH (Dang y Semenza, 1999, Minchenko et al. 2003; Moreno et al., 2007).

Diversos reportes indican que HIF-1 se encuentra sobre-expresado en diferentes tipos de tumores y en sus metástasis, pero no en sus tejidos de origen o tumores benignos (Gatenby y Gillies, 2004; Robey et al. 2005).

ONCOGENES

Además de HIF-1, se han identificado algunos oncogenes que podrían incrementar la glucólisis ya que aumentan la transcripción de enzimas glucolíticas (PFK-1, GAPDH, PK, HPI, PGK, ENO y LDH) y del GLUT1, como es el caso del oncogen *c-myc* (Dang et al. 1997; Osthus et al. 2000 y Moreno et al. 2007). *c-*

Myc es una proteína que pertenece a una familia de factores de transcripción constituida por L-Myc, N-Myc y c-Myc; esta familia de proteínas Myc se encuentran involucradas en la regulación de la proliferación celular, apoptosis y crecimiento celular (Baena et al.2005).

2.5.3 Cambios en los mecanismos de regulación de la HK y de la PFK

La HK y la PFK-1 son las enzimas de la glucólisis que ejercen la mayor parte del control sobre el flujo glucolítico. Esto determinado en diversos modelos de tejidos no tumorales como eritrocitos humanos, hepatocitos, corazón y músculo esquelético de rata. Las isoformas de estas enzimas se incrementan en las células tumorales y al parecer influyen en el incremento del flujo glucolítico (Kashiwaya et al., 1994; Sánchez y Aragón, 1997; Weber, 2001 y Moreno et al., 2007).

HEXOCINASA (HK)

La HK cataliza la fosforilación de glucosa a G6P. En las células de mamífero existen diferentes isoformas de la HK (HKI, HKII, HKIII, y HKIV) que presentan diferentes propiedades cinéticas, especificidad y localización (Cornish y Cardenas, 1991; y Wilson 2003). La isoforma predominante en cerebro, glándula mamaria, riñón y retina es la HKI (Wilson 2003); la HKII predomina en el músculo esquelético y en las células adiposas, sin embargo su actividad es relativamente más baja (Wilson, 2003).

En las células tumorales de rápido crecimiento, la isoforma predominante es la HK-II con excepción de las células tumorales de cerebro en las cuales predomina HK-I. (Cornish y Cardenas, 1991; Wilson 2003; y Moreno et al., 2007). En los hepatomas de Norvikoff, H19 y AS-30D, la actividad de la HK-II es de 20-306 veces superior a la actividad en células de hígado de rata (Marín et al., 2006; Nakashima et al., 1988; Bustamante y Pedersen 1977).

La G6P es un potente inhibidor de HKI, HKII y HKIII (Wilson 2003). Sin embargo, hay reportes que indican que al encontrarse unida la HKII a la membrana externa mitocondrial (como ocurre en las células tumorales) disminuye la inhibición que ejerce la G6P, además de brindar a la enzima protección frente a proteasas y proveer de acceso directo al ATP generado por la mitocondria (Moreno et al., 2007). Por este motivo se consideraría que la HK no estaría ejerciendo un control importante sobre la glucólisis en las células tumorales.

FOSFOFRUCTOCINASA TIPO I (PFK-I)

Esta enzima cataliza la fosforilación de fructosa-6-P (F6P) para formar la fructosa-1,6-BP (F-1,6-BP). En las células de mamíferos hay tres tipos de isoenzimas de PFK-I: L, M y C (Aguirre y Sotelo, 2008 y Moreno et al., 2007). En hígado y riñón la isoenzima predominante es la L, en el músculo esquelético la más abundante es la M, en las plaquetas sólo hay isoenzima C y en el cerebro existen las tres isoenzimas (Dunaway et al. 1988, Sánchez y Aragón 1997, Moreno et al., 2007).

En diferentes tipos de tumores malignos humanos, de rata y líneas celulares las subunidades C y L predominan. Las subunidades de PFK-I tienen diferentes propiedades cinéticas, por lo tanto las propiedades del heterotetrámero tanto cinéticas como regulatorias dependen del tipo y la proporción de las diferentes subunidades (Oskam et al., 1985; Sánchez y Aragón, 1997; Aguirre y Sotelo, 2008).

La PFK-I de tumores es menos sensible a la inhibición por ATP y citrato que la PFK-I normal, ya que en células normales de cerebro la K_i por citrato es de 0.1mM y en células normales de gliomas la K_i es de 0.75 mM. Además en gliomas humanos la PFK-I es más sensible a la activación por F-2,6-BP con una $K_a = 1 \mu\text{M}$ menor que la $K_a = 5 \mu\text{M}$ de la enzima de cerebro normal (Staal et al., 1987 y Moreno et al., 2007).

FOSFOFRUCTO CINASA TIPO II (PFK-2)

Existen cuatro diferentes isoformas de PFK-2 en las células de mamífero: PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB-3 y PFKFB-4. La PFK-2 es una enzima bifuncional con actividad de cinasa y fosfatasa; esta enzima modula la concentración celular de F-2,6-BP metabolito que es el activador más potente de la PFK-1 en células normales y tumorales. (Atsumi et al., 2002; Minchenko et al., 2003; Aguirre y Sotelo, 2008)

La sobre-expresión de PFK-2 conlleva a un incremento en fructosa-2,6-bifosfato (F-2,6-BP) en las células tumorales ya que la isoenzima PFKFB-3 es la que se

expresa en las células tumorales; dicha isoenzima incrementa la concentración de F-2,6-BP pues posee una mayor actividad de cinasa que de fosfatasa con respecto a las otras isoenzimas, contribuyendo así a la acumulación de F-2,6-BP (Atsumi et al., 2002; Minchenko et al., 2003; Aguirre y Sotelo, 2008). Este mecanismo contribuye importantemente al incremento en el flujo glucolítico de las células tumorales con la pérdida del efecto Pasteur (Marin et al., 2006; y Moreno et al., 2007).

2.5.4 Distribución del control de la glucólisis en las células tumorales

La glucólisis en las células de mamífero está controlada principalmente por la hexocinasa (HK) con un 70% y la fosfofructo cinasa tipo I (PFK-I) con un 30% (Rapoport et al., 1974). Sin embargo se ha observado que en las células tumorales AS-30D (de hepatoma de rata) la regulación cambia, ya que la HK junto con el transportador de glucosa (GLUT) controlan un 71%, la PFK-I 4% y entre el resto de las enzimas de parte baja de la glucólisis (bloque formado por la aldolasa-lactato deshidrogenasa) el 25% (Marín et al., 2006).

En este estudio se estableció que la pérdida de control por parte de la PFK-1 tumoral se debe al incremento en la actividad de la enzima y a la acumulación de la F-2,6-BP, activador que bloquea la inhibición que ejercen tanto el citrato como el ATP sobre la enzima. En cambio, aunque la HK incrementó su actividad mantuvo un control importante porque su producto la G6P inhibió fuertemente su actividad independientemente de que se encontrara unida a la membrana externa

mitocondrial o libre en el citosol. Esto sugirió que la unión de la HK a la membrana externa no evitaba la inhibición por la G6P. Finalmente, el GLUT por su baja actividad mantuvo un control importante.

Con base a estos antecedentes, ahora en este trabajo de tesis se trata de establecer cuáles son las enzimas que controlan la glucólisis en las células tumorales humanas.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 JUSTIFICACIÓN

Tanto el cáncer cérvico-uterino como el cáncer de próstata representan una causa de muerte muy elevada en mujeres y en hombres, respectivamente. Actualmente los principales y más usados tratamientos se enfocan en alterar la reproducción celular atacando directamente a nivel de DNA, con el fin de que las células tumorales frenen su crecimiento. Sin embargo los medios empleados para este fin (quimioterapia, agentes alquilantes, radioterapia, etc.), no son selectivos pues atacan tanto a las células tumorales como a las no tumorales.

Por lo anterior, extender el estudio del control de la glucólisis a células tumorales humanas puede ser de gran utilidad para poder dilucidar nuevos blancos terapéuticos, que podrían ser más específicos contra las células tumorales y permitir la elaboración de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer.

En este trabajo utilizaremos como modelos de estudio células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) y de cáncer de próstata (PC-3).

3.2 HIPÓTESIS

En las células tumorales humanas los principales puntos de control son el transportador de glucosa (GLUT) y la hexocinasa (HK) como ocurre en las células tumorales AS-30D.

3.3 OBJETIVO GENERAL

Determinar qué enzimas controlan la glucólisis en las células tumorales humanas HeLa y PC-3.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los parámetros cinéticos de cada enzima de la glucólisis en extractos de células de cáncer cérvico-uterino (HeLa).
- Determinar las actividades de la HK y la PFK-1 en las células PC-3.
- Determinar las concentraciones de los siguientes metabolitos G6P, F6P, F-1,6-BP y ATP en las células tumorales HeLa y PC-3.
- Medir los flujos glucolíticos en las células tumorales HeLa y PC-3.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 CULTIVO DE CÉLULAS

HeLa

Estas células provienen de un adenocarcinoma epitelial de cérvix estadio IV de una mujer de 31 años. Se ha reportado que contienen secuencias del virus del papiloma humano 18 (HPV-18) (<http://www.atcc.org>).

PC-3

PC-3 son células provenientes de un adenocarcinoma de próstata estadios IV de un hombre de 62 años; estas células exhiben bajo ácido prostático y actividad testosterona-5- α -reductasa (<http://www.atcc.org>).

Ambas líneas tumorales fueron cultivadas a 37 °C, en medio de cultivo Eagle's Dulbeco's modificado (DME) adicionado con 3.7 g/L de NaHCO₃, HEPES 6 g/L, 10, 000 U de penicilina/estreptomicina y suero fetal bovino 5 %; dicho medio fue previamente esterilizado mediante filtración usando una membrana de poro de 0.22 μ m.

4.2 EXTRACTOS CELULARES

Las células se emplearon cuando alcanzaron un 90-95 % de confluencia.

1. Se lavaron las células con medio Ringer-Krebs pH 7.4.
2. Se despegaron raspando la botella de cultivo empleando un "scraper".

3. Se centrifugaron a 400 X *g*, durante 3 min a temperatura ambiente.
4. El botón se resuspendió en Ringer-Krebs y se centrifugó nuevamente a 400 X g durante 3 min a temperatura ambiente.
5. Se cuantificó la proteína celular por el método de Biuret, para calcular la cantidad de medio (Tris-HCl 25 mM pH 7.6, adicionado con EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y DTT 5 mM) necesario para resuspender el botón de células, con base la relación 10 mL de medio por cada 650 mg de células.
6. Las células resuspendidas fueron sometidas a congelación en nitrógeno líquido y posteriormente se descongelaron en un baño maría a 37°C. Este proceso se realizó dos veces más.
7. Posteriormente se centrifugó a 17 500 X *g* a 4 °C durante 5 min y se recuperó el sobrenadante.
8. Se realizó otra centrifugación a 17 500 X *g* durante 15 min a 4 °C y se recupero el sobrenadante.
9. Al sobrenadante restante se le cuantifico proteína por el método de Lowry.
10. Los extractos se conservaron adicionando 10 % (v/v) de glicerol y en refrigeración a -72 °C para su posterior empleo.

4.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR BIURET

Se realiza una curva con albúmina (BSA) al 10 % con concentraciones de 0.5, 1.0, y 2.0 mg siguiendo el siguiente procedimiento.

Se colocó una serie de 6 tubos con 800 μ L de agua y se adiciono BSA (10 %) y muestra como se indica a continuación:

1. Blanco (s/BSA y s/muestra)
2. 5 μ L de BSA
3. 10 μ L BSA
4. 20 μ L BSA
5. 20 μ L de extracto
6. 40 μ L de extracto

A continuación se adicionan 50 μ L de desoxicolato (DOC), se agita y se deja incubar por 10 min.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregan 100 μ L de sulfato de cobre (CuSO₄), se deja incubar por otros 10 min y se determina la absorbencia a $\lambda = 540$ nm.

Posteriormente se realiza una regresión lineal y se interpolan los valores de las muestras para obtener la concentración de proteína presente en los extractos.

4.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR LOWRY

Se realiza una curva de la siguiente manera

1. 0 μ L BSA + 100 μ L agua
2. 20 μ L BSA + 80 μ L agua
3. 40 μ L BSA + 60 μ L agua
4. 60 μ L BSA + 40 μ L agua
5. 80 μ L BSA + 20 μ L agua
6. 20 μ L de extracto + 80 μ L agua

7. 60 μL de extracto + 40 μL de agua

Posteriormente se adiciona 1mL de una solución preparada con 50 partes de la solución B en 1 parte de la solución A, se agita vigorosamente y se deja incubar por 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 100 μL de Folin, se agitó y se dejó incubar por espacio de 15min. Posteriormente se midió la absorbencia a 660nm. Se realizó la regresión lineal y se interpoló para calcular la concentración de proteína presente en los extractos.

4.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Las velocidades máximas de cada enzima se determinaron en condiciones de velocidad inicial (concentraciones saturantes de los sustratos). Se monitoreo la aparición o desaparición de NAD(P)H a 340 nm. Todos los ensayos se realizaron en medio MOPS 50 mM, pH 7, en celdas de plástico de 1mL de acuerdo con Saavedra et al (2005).

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de obtener los parámetros cinéticos de cada una de las enzimas: velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m). Ver Apéndice.

Además antes de proceder a realizar cada ensayo se efectuaron mediciones previas para garantizar que los ensayos se realizaran dentro de la zona lineal de la reacción enzimática. En dichos ensayos se colocaron diferentes cantidades de proteína en presencia de concentraciones saturantes de sustrato (10 veces la K_m)

para garantizar que estos no fueran limitantes en la reacción. Esto se repitió hasta determinar la cantidad de proteína con la cual los nmol de producto obtenido eran directamente proporcionales con la cantidad de proteína agregada.

Cabe mencionar que para cada una de las cinéticas realizadas se efectuaron por lo menos 6 puntos variando la concentración del sustrato los cuales fueron cuantificados el mismo día espectrofotométricamente usando ensayos acoplados.

Hexocinasa (HK)

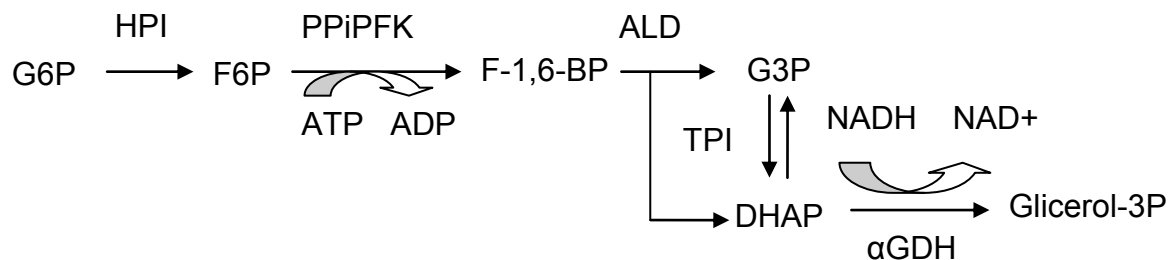
Reacción



Se empleó NADP^+ 1 mM, G6PDH 1 U, MgCl_2 15 mM, y ATP 10 mM. La reacción se arrancó variando las concentraciones de glucosa de 0.004 a 5.1 mM. Además se variaron las concentraciones de ATP entre 0.3 mM a 6 mM.

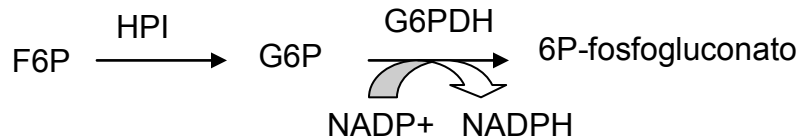
Hexosa fosfato isomerasa (HPI)

Reacción directa



Se colocó en la celda MgCl_2 1 mM, EDTA 1 mM, NADH 0.15 mM, PPI 1 mM, ALD 0.36 U, TPI 1.8 U, αGDH 0.6 U, PPI-PFK recombinante de *Entamoeba histolytica* 0.5 U y G6P de 0.02 a 8.4 mM como sustrato para arrancar la reacción.

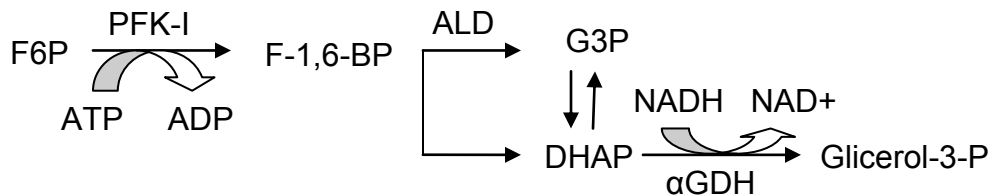
Reacción reversa



Para esta medición se empleó NADP^+ 1 mM, G6PDH 1 U, y F6P de 0.035 a 3.5 mM con la cual se arrancó la reacción.

Fofofructocinasa tipo I (PFK-I)

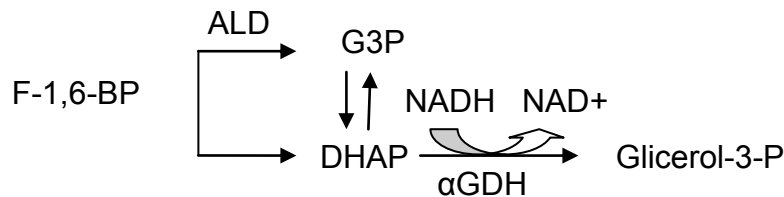
Reacción



Se colocó MgCl_2 5 mM, EDTA 1mM, NADH 0.15 mM, αGDH 0.6U, TPI 1.8 U, ALD 0.36 U, ATP 0.8 mM y la concentración de F6P con la que se arrancó la reacción. Se varió de 1 a 17.5 mM para determinar la K_m , en el caso de la K_m por ATP se varió la concentración de ATP en concentraciones de 0.1 a 1.9 mM, arrancando la reacción con F6P 10 mM.

Aldolasa (ALD)

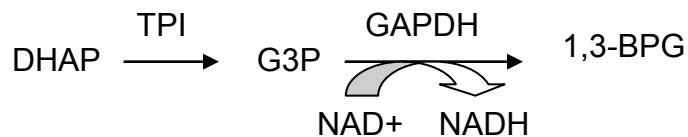
Reacción



En la celda de reacción se colocaron: NADH 0.15 mM, α GDH 0.6 U, TPI 1.8 U y se arrancó la reacción con diferentes concentraciones de F-1,6-BP (0.003 a 0.58 mM).

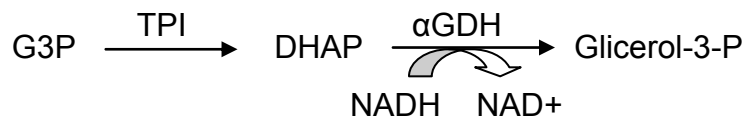
Triosafosfato isomerasa (TPI)

Reacción directa



La mezcla de reacción consistió en EDTA 2.5 mM, NAD⁺ 1 mM, cisteína 5 mM, AsO₄ 10 mM, GAPDH 3 U y DHAP de 0.05 a 1.85 mM para arrancar la reacción.

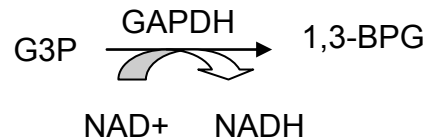
Reacción reversa



La reacción reversa se midió en presencia de EDTA 2.5 mM, NADH 0.15 mM, α GDH 3.4 U y se arrancó la reacción con diferentes concentraciones de G3P (0.02 a 1.3 mM).

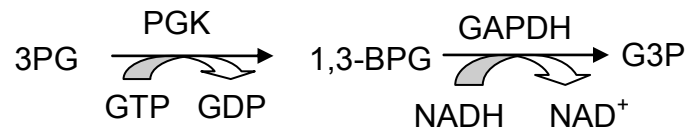
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Reacción directa



En la celda de reacción se adicionó: NAD^+ 1mM, cisteína 5 mM, arsenito 50 mM y G3P de 0.03 a 1.24 mM para arrancar la reacción.

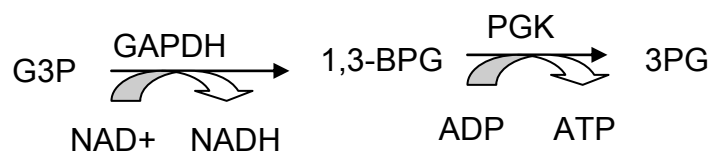
Reacción reversa



La actividad se determinó en presencia de MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, cisteína 5 mM, GTP 0.6 mM y 4 U de PGK recombinante de *Entamoeba histolytica*. Se arrancó la reacción con 3PG variando las concentraciones entre 0.03 a 2.63 mM y con una concentración fija de NADH (0.15 mM). En otro ensayo para determinar la K_m por NADH se variaron las concentraciones de éste entre 0.01 a 0.70 mM manteniendo fija la concentración de 3PG a 5 mM.

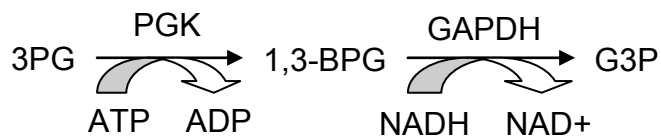
Fosfoglicerato cinasa (PGK)

Reacción directa



Esta medición se realizó en amortiguador de KH_2PO_4 50 mM y pH 7, en presencia de MgCl_2 5 mM, DTT 2 mM, EDTA 1 mM, NAD^+ 0.7 mM, GAPDH 3 U, ADP 1 mM y G3P de 0.02 a 1.58 mM para arrancar la reacción.

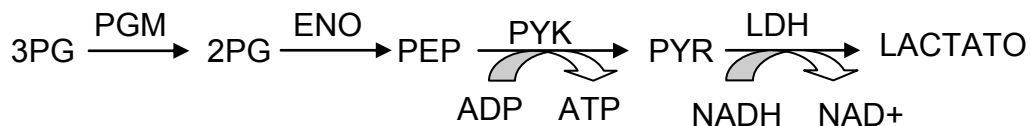
Reacción reversa



Esta actividad se midió en presencia de MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, NADH 0.15 mM, 1.6 U de GAPDH, ATP 2 mM y 3 PG de 0.01 a 0.84 mM para arrancar la reacción.

Fosfoglicerato mutasa (PGAM)

Reacción directa



La celda de reacción contenía: MgCl_2 5 mM, NADH 0.15 mM, PYK 0.7 U, LDH 0.7 U, ADP 1.2 mM, enolasa recombinante de *Entamoeba histolytica* 1 U y se arrancó la reacción con diferentes concentraciones de 3PG (0.06 a 2.3 mM).

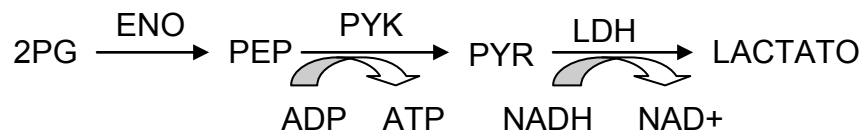
Reacción reversa



Esta reacción se midió en presencia de MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, NADH 0.15 mM, PGK recombinante de *Entamoeba histolytica* 0.16 U, GAPDH 1.6 U, GTP 1 mM y 2PG como sustrato para arrancar la reacción en un intervalo de concentraciones de 0.004 a 1.0 mM.

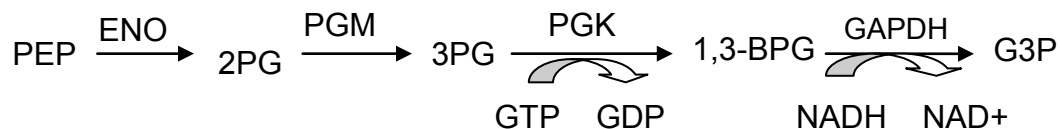
Enolasa (ENO)

Reacción directa



La mezcla de reacción donde se midió la actividad contenía MgCl_2 5 mM, NADH 0.15 mM, PYK 0.7 U, LDH 0.7 U, ADP 1.2 mM, y se arrancó la reacción con diferentes concentraciones de 2PG (0.01 a 0.80 mM).

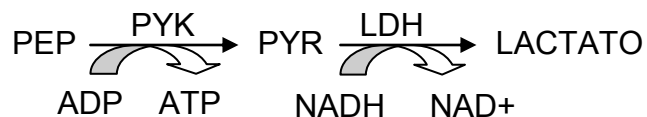
Reacción reversa



Esta reacción se midió en presencia de MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, NADH 0.15 mM, GTP 1.7 mM, PGM y PGK recombinantes de *Entamoeba histolytica* 0.2 U y 1.2 U respectivamente y GAPDH 1.6 U. La reacción se arrancó con diferentes concentraciones de PEP 0.01 a 0.84 mM,

Piruvato cinasa (PYK)

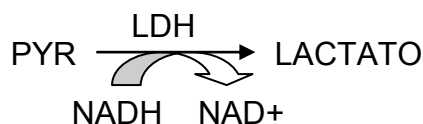
Reacción



La celda de reacción contenía MgCl_2 5 mM, NADH 0.15 mM, LDH 4.1 U, PEP 1mM y se arrancó la reacción con diferentes concentraciones de ADP (0.01 a 0.9 mM). Para determinar la afinidad por PEP, se mantuvo fija la concentración de ADP a 1mM y se arrancó la reacción con diferentes concentraciones de PEP (0.005 a 0.332 mM).

Lactato deshidrogenasa (LDH)

Reacción



La actividad se midió en presencia de NADH 0.15 mM y se arrancó la reacción con diferentes concentraciones de piruvato (0.04 a 2.12 mM).

En estas mediciones se observaron gráficos como se muestra en la Figura 4 y 5 en base a los cuales se determinaron los cambios de absorbencia (ΔAbs) y de tiempo (Δt) con los que fue posible calcular la actividad para cada concentración de sustrato empleada.

Con los cambios de absorbencia (ΔAbs) y de tiempo (Δt) se realizaron los siguientes cálculos para conocer la actividad de enzimática:

DATOS:

ϵ = coeficiente de absortividad molar para el NADH

$$\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \quad \Delta t = 3 \text{ min} \quad \Delta \text{Abs} = 0.025$$

Proteína contenida en el extracto celular empleado en el ensayo = 0.049 mg

Entonces: Actividad = $0.025 / 6.22 \text{ mM}^{-1} = 4.02 \times 10^{-3} \text{ mM}$ de NADH en la cubeta. Como todas las reacciones fueron efectuadas en celdas de 1 mL por lo cual:

$$4.02 \times 10^{-3} \text{ mM} (1000 \mu\text{M}/1\text{mM}) = 4.02 \mu\text{M} = 4.02 \mu\text{mol/L} = (4.02 \text{ nmol/mL}) * (1\text{mL}) = 4.02 \text{ nmol}$$

$$4.02 \text{ nmol} / 3 \text{ min} = (1.34 \text{ nmol} / \text{min}) / (0.049 \text{ mg de proteína}) = 27.3 \text{ nmol} / \text{min} * \text{mg de proteína.}$$

Una unidad de enzima (U) se refiere a los micromoles por minuto de producto obtenidos en una reacción enzimática ($U = \mu\text{mol} / \text{min} = 1000 \text{ nmol}/\text{min}$).

Por lo cual:

$$\text{Actividad} = (27.3 \text{ nmol}/\text{min} * \text{mg de proteína}) / (1000 \text{ nmol}/\text{min})$$

$$\text{Actividad} = 0.0273 \text{ U} / \text{mg de proteína.}$$

Con las actividades calculadas para cada concentración de sustrato empleada se graficó en el programa Origin 5.0 y se realizaron los ajustes no lineales dependiendo de la cinética de cada enzima y mediante estos gráficos se determinaron los parámetros cinéticos, velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis-Menten (K_m) como se muestra en el ejemplo contenido en la Figura 6.

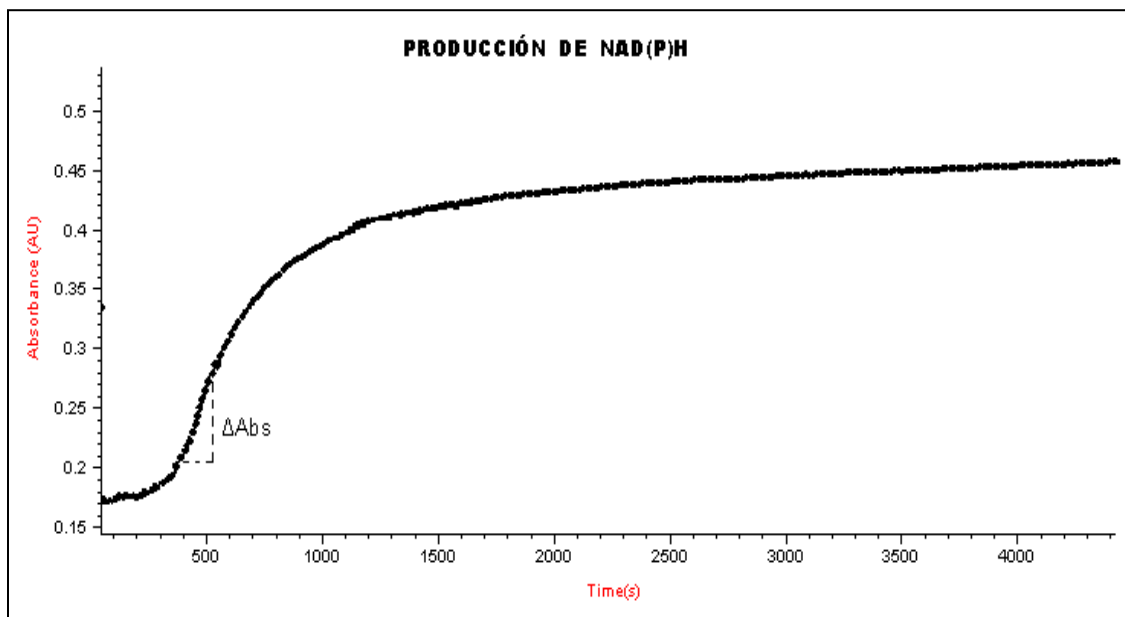


Figura 4. Ejemplo de gráfico obtenido en una reacción enzimática en la cual se monitoreó la aparición de NAD(P)H

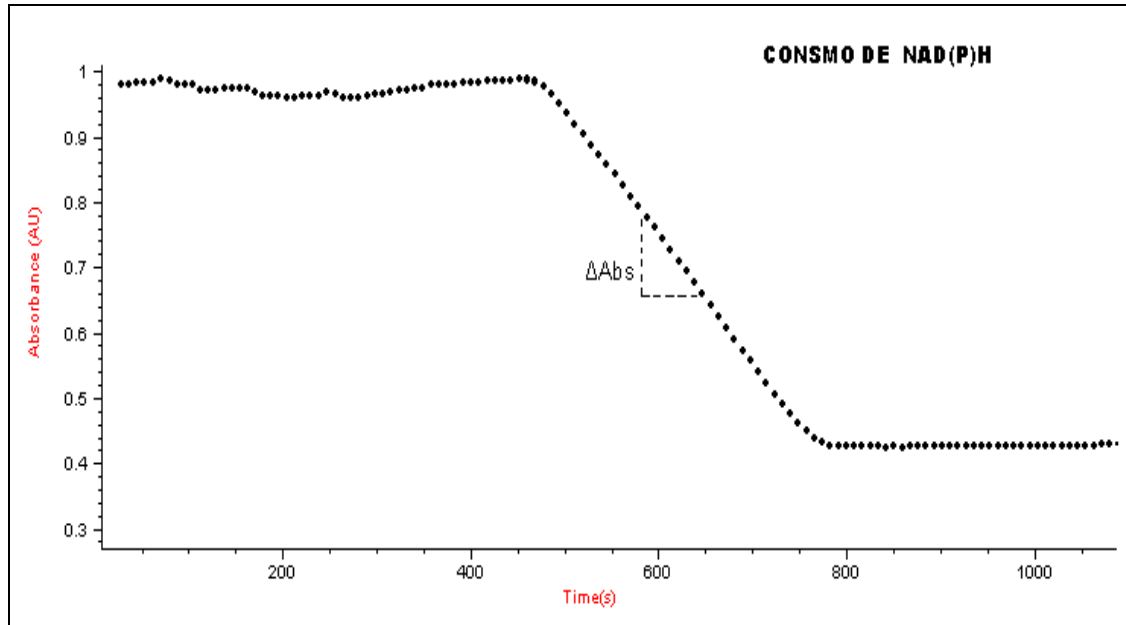


Figura 5. Ejemplo de gráfico obtenido en una reacción enzimática en la cual se monitoreó el consumo de NAD(P)H

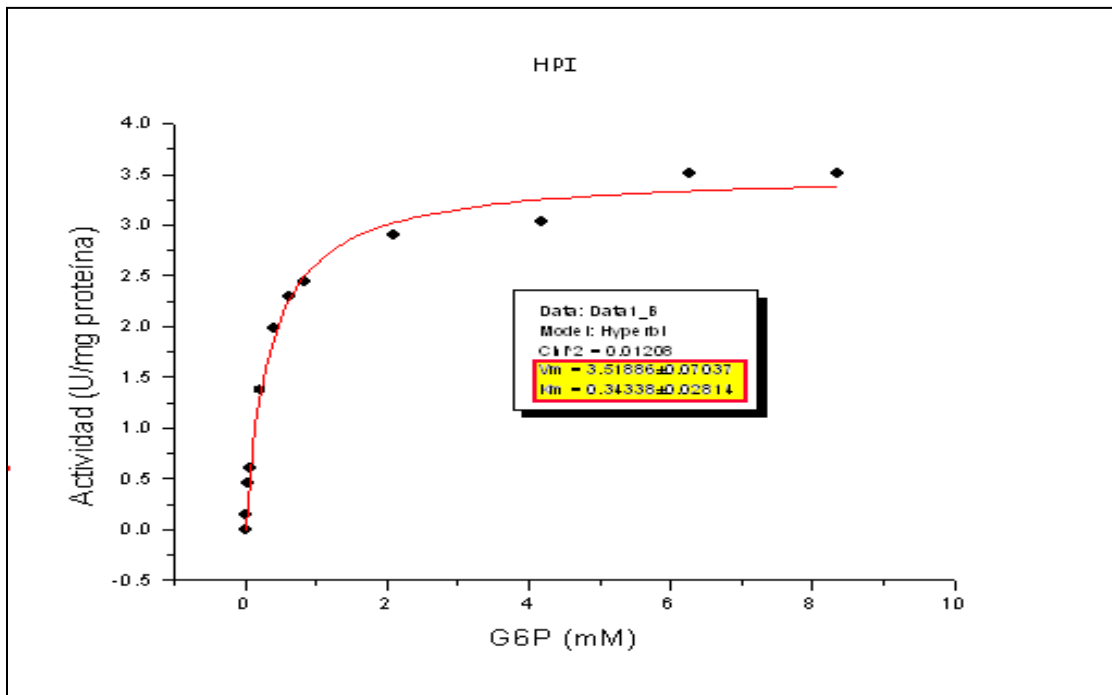
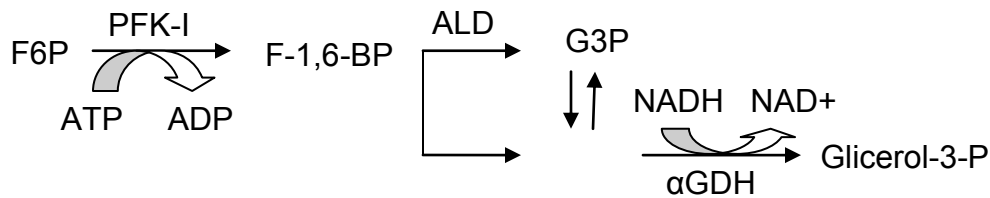


Figura 6. Ejemplo de gráfico obtenido al realizar el ajuste no lineal con los datos obtenidos en el ensayo de la enzima HPI en el programa Origin 5.0 para obtener los parámetros cinético K_m y V_{max}

4.6 MEDICIÓN DE PFK-1 CON ACTIVADOR (F-2,6-BP)

El ensayo se realizó prácticamente igual al descrito anteriormente para la actividad de la PFK-1. Se colocó en celdas de 1mL $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 1 mM, NADH 0.15 mM, α -GDH 0.62 U, TPI 1.8 U, ATP 0.8 mM, ALD 0.36 U y F6P 10 mM para arrancar la reacción. Se realizaron varios ensayos adicionando a las celdas diferentes concentraciones de F-2,6-BP para evaluar su efecto activador (5 μ M, 10 μ M, 30 μ M y 50 μ M), en estos se monitoreó la desaparición de NADH en el ensayo acoplado descrito a continuación.



Posteriormente se efectuó el mismo ensayo manteniendo la concentración de F6P fija en 2.4 mM (concentración intracelular de HeLa) y otro con concentración de 0.4 mM de F6P (concentración intracelular de AS-30D) en el cual se varió la concentración de F-2,6-BP en un intervalo de 0 mM a 5.0 mM.

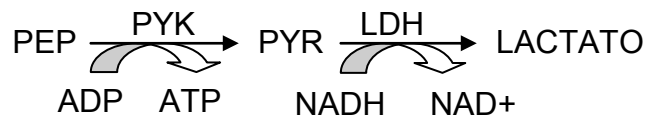
4.7 MEDICIÓN DE HK CON INHIBIDOR (G6P)

En una celda de 2.0 mL se colocó la cantidad de extracto citosólico necesaria para tener 1.4 mg de proteína aproximadamente en presencia de MgCl_2 5 mM, ATP 3mM, oligomicina $1\mu\text{M}$; se incubó durante 3 min en baño maría a 37°C , además el ensayo se realizó variando concentraciones de G6P de 0.0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mM.

Transcurridos 50 s de la incubación se tomó una alícuota de $500\mu\text{L}$ a la cual se le adicionó $50\mu\text{L}$ de HClO_4 30 % / EDTA 10 mM y se centrifugó a $1118 \times g$ durante 2 min. El sobrenadante se colectó y se neutralizó con KOH 3 M / TRIS 0.1 M con ayuda del indicador de Kodak; una vez neutralizado fue centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones. El sobrenadante se recolectó y se guardó a -72°C para su posterior uso. Esta alícuota tomada representa el blanco de la reacción.

Después de 1 min de incubación se adicionó a la celda 1 mM de glucosa y se dejó transcurrir la reacción durante 3 min, luego de los cuales se tomó otra alícuota de 500 μ L que se procesó como se describió anteriormente.

El sobrenadante resultante del tratamiento de las muestras se descongeló y centrifugó a 1118 X g por 3 min; en éste se cuantificó el ADP generado por la actividad de HK en las muestras. La cuantificación fue realizada espectrofotométricamente midiendo la desaparición de NADH, para la cual se colocó en celdas de 1.0 mL $MgCl_2$ 5 mM, NADH 0.15mM, LDH 2.7 U, y PK 0.25 U. La reacción se arrancó con PEP 1 mM.



4.8 ENSAYO DE GLUCÓLISIS

En un frasco se colocaron de 2 a 10 mg de células con la cantidad adecuada de medio para obtener un volumen final de 2.0 mL, se incubo a 37 °C durante 13 min. Transcurridos 9.3 min se tomó una alícuota de 500 μ L a la que se agrego 50 μ L de $HClO_4$ 30 % / EDTA 10 mM; a los 10 min se adiciono 5 mM de glucosa, transcurridos 13 min se tomó una alícuota de 1000 μ L y se añadió también $HClO_4$ 30 % / EDTA 10 mM.

Las muestras en perclórico se centrifugaron a 1118 X *g* durante 2 min, se recolectó el sobrenadante y se neutralizó con KOH 3 M / TRIS 0.1 M con ayuda de indicador de Kodak. Posteriormente las muestras una vez neutralizadas se centrifugaron nuevamente durante 2 min a 1118 X *g* recolectando el sobrenadante el cual se congeló a -72°C para la posterior medición de ácido láctico e intermediarios (ATP, G6P y F6P)

4.9 CUANTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS

Se cuantificó la G6P, la F6P y el ATP presentes en las células en extractos generados en los ensayos de glucólisis.

Se colocó en celdas de cuarzo 5 mM MgCl_2 , 2 mM de glucosa, 1 mM NADP, y 100-500 μL del extracto. Se monitoreó espectrofotométricamente a 340 nm la aparición de NADPH. Para efectuar la cuantificación de G6P se arrancó la reacción con 1 U de G6PDH, para cuantificar la F6P se arrancó con 1 U de HPI y finalmente para el ATP con 1.5 U de HK (Figura 7). Con los deltas de absorbencia se calculó la cantidad de intermediario presente en los extractos como se muestra en el siguiente ejemplo.

DATOS:

ϵ = coeficiente de absortividad molar para el NADPH

$$\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \quad \Delta\text{Abs} = 0.025$$

Proteína contenida en el extracto celular empleado en el ensayo = 0.049 mg

Entonces:

$[G6P] = 0.025 / 6.22 \text{ mM}^{-1} = 4.02 \times 10^{-3} \text{ mM}$ de NADPH que es la concentración en la cubeta. Como la cuantificación se realizó en celdas de cuarzo de 2 mL por lo cual:

$[G6P] = 4.02 \times 10^{-3} \text{ mM} (1000\mu\text{M}/1\text{mM}) = 4.02 \mu\text{M} = 4.02 \mu\text{mol/L} = (4.02 \text{ nmol/mL})$

$*(2\text{mL}) = 8.04 \text{ nmol}/0.049 \text{ mg} = 164 \text{ nmoles/mg}$ de proteína.

Lo anterior se repitió para el resto de los metabolitos.

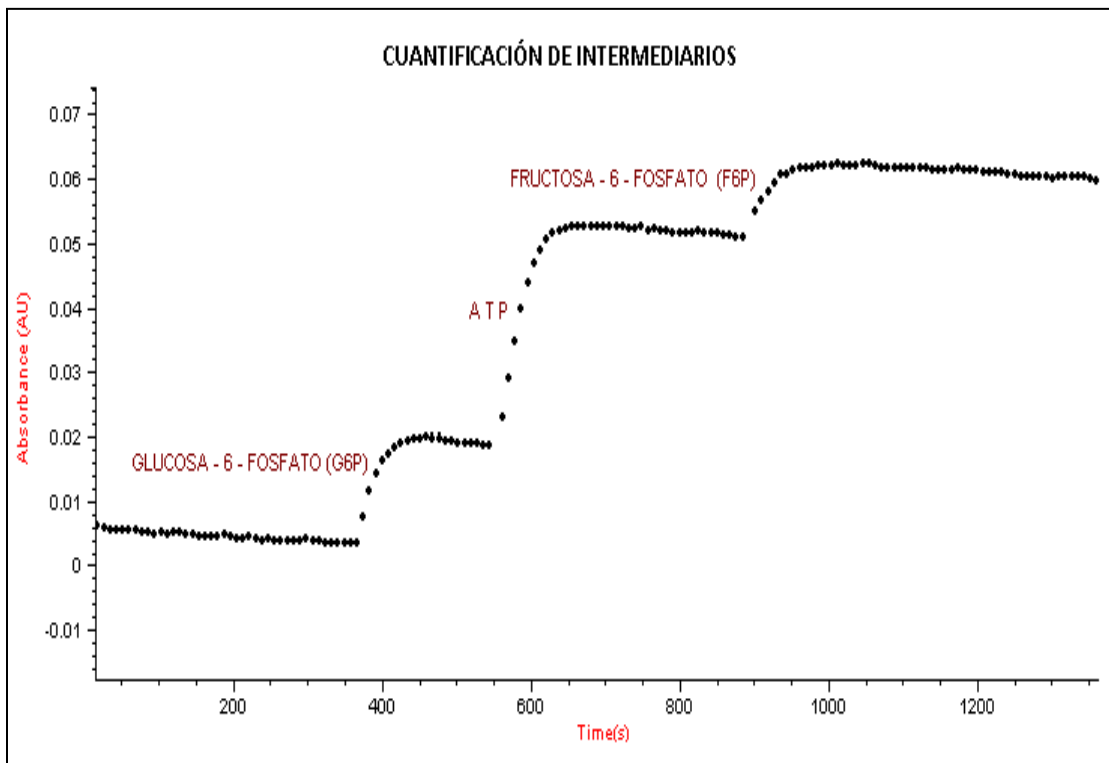


Figura 7. Gráfico obtenido en la cuantificación de intermediarios de la glucólisis (G6P, F6P y ATP).

4.10 CUANTIFICACIÓN DE LÁCTICO

Se midió espectrofotométricamente la aparición de NADH colocando en celdas de cuarzo: NAD⁺ 1 mM, LDH 28 U, y arrancando la reacción con el extracto obtenido

en la realización del ensayo de glucólisis. La reacción se efectuó en medio Hidracina 0.4 M / Glicina 0.5M.

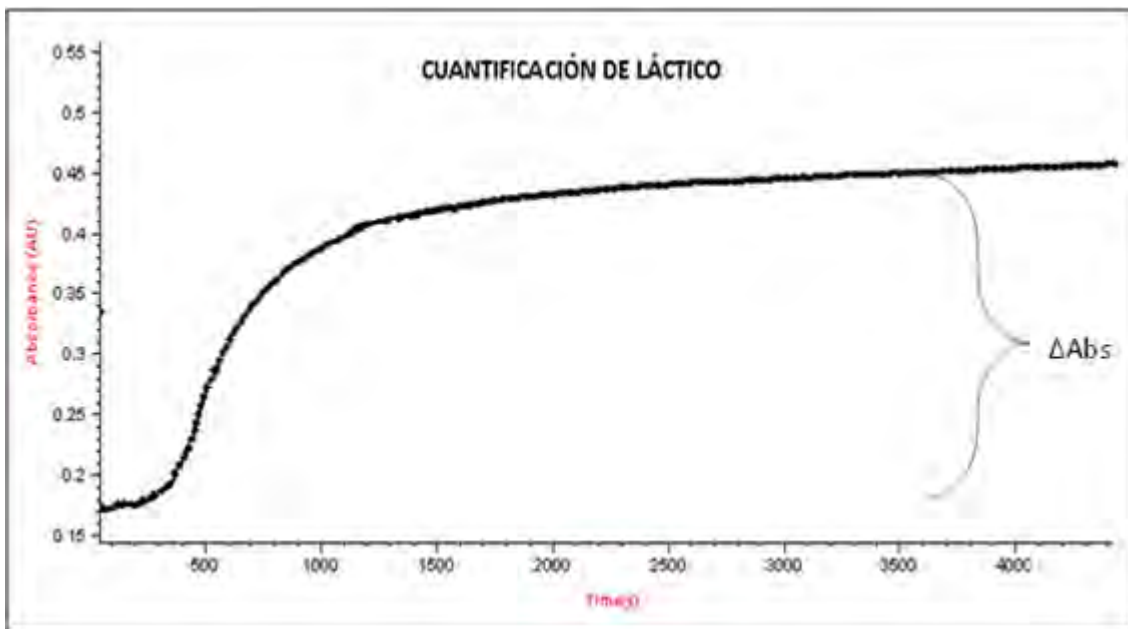


Figura 8. Ejemplo del gráfico obtenido en el ensayo de cuantificación de láctico.

Con el cambio de absorbancia y de tiempo obtenidos en el gráfico se calculó la cantidad de lactato presente procesando los datos como se indica en las páginas 30 – 31.

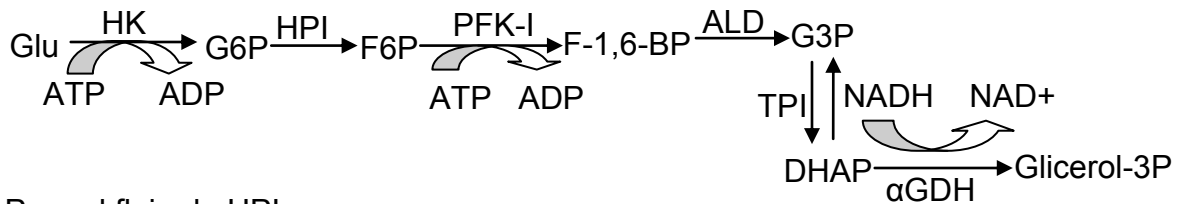
4.11 MEDICIÓN DE FLUJOS

Se midió espectrofotométricamente la desaparición de NADH. En celdas de plástico de 1.0 mL se colocaron los siguientes reactivos: ATP 10 mM, α GDH 3.4 U, $MgCl_2$ 15 mM, NADH 0.15 mM y F-2,6-BP 6 μ M para lograr medir los flujos a través de las enzimas presentes en los extractos celulares.

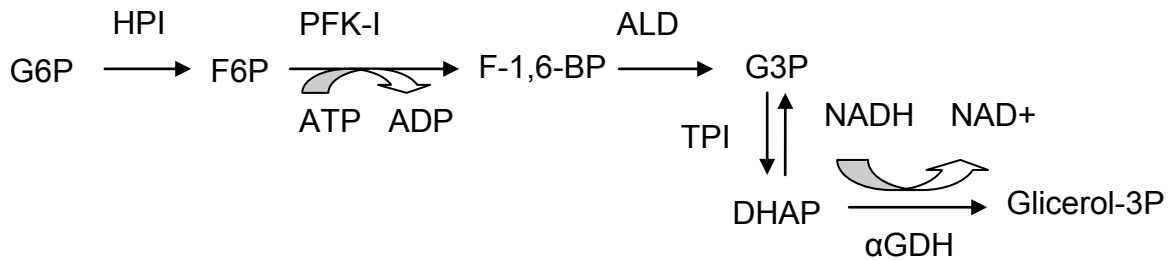
Para registrar el flujo de la HK la reacción se arrancó con 2 mM de glucosa, para el de HPI se inició con 10 mM de G6P, para PFK-I con 5 mM de F6P y finalmente

para detectar el flujo de ALD con 1 mM de F-1,6-BP. Los ensayos acoplados fueron los siguientes:

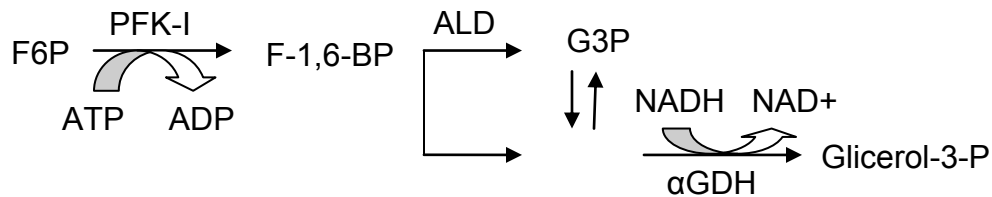
Para el flujo e Hexocinasa



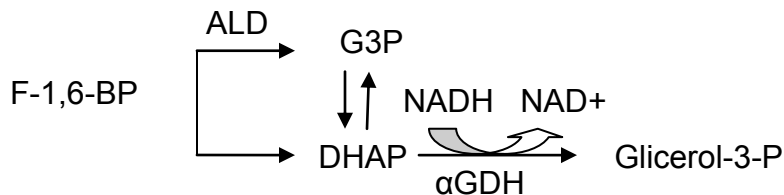
Para el flujo de HPI



Para el flujo de PFK-I



Para el flujo de ALD



Se obtuvieron gráficos como el que se presenta a continuación (Figura 9) con los que fue posible calcular el flujo de cada una de las enzimas con los cambios de absorbencia y de tiempo obtenidos empleando el mismo algoritmo de cálculo descrito en la pág. 30 – 31.

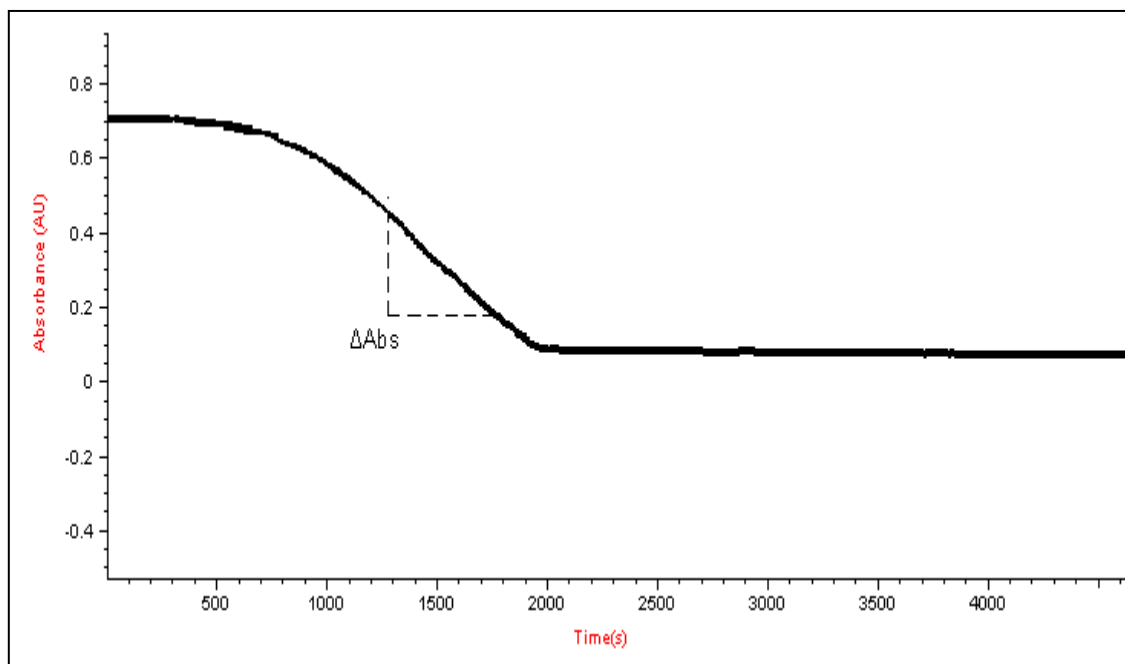


Figura 9. Gráfico obtenido en la determinación de flujos glucolíticos.

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de cada enzima se encuentran en la Tabla 2 para la reacción directa y en la Tabla 3 para la reacción reversa, tanto para las enzimas de HeLa y de AS-30D. Estos parámetros se determinaron a pH 7 y 37 °C, para simular las condiciones fisiológicas en las que pueden encontrarse las enzimas en el citosol de las células tumorales, en las cuales el pH se reduce de 7.2 a 6.8 cuando se activa la glucólisis (Rodríguez-Enríquez et al., 2001).

En las tablas podemos observar que a excepción de la PGK y de la PYK, en su mayoría las afinidades encontradas para las enzimas de HeLa son similares a las reportadas para las enzimas de AS-30D, lo que sugiere que pueden tratarse de las mismas isoformas. Como ocurre en el caso de la HK, en donde las afinidades por ATP y glucosa corresponden a las reportadas para la HKII (Wilson JE, 2003). Esto no es extraño considerando que diversos autores reportan que la HKII es la enzima que predomina en células tumorales.

En cambio la *K_m* de la PGK por ADP y la de la PYK por PEP sugieren la expresión de diferentes isoformas en HeLa con respecto a AS-30D. Algo similar ocurre con el transportador de glucosa (Tabla 4), ya que de acuerdo con reportes de nuestro laboratorio en AS-30D se expresa el GLUT3 que tiene mayor afinidad por glucosa, en tanto que en HeLa se expresa el GLUT1 que tiene una baja afinidad (Rodríguez-Enríquez et al., 2009). Sin embargo, a pesar de que se conocen dos isoenzimas de la PGK y cuatro de la PYK, es difícil establecer que isoforma se expresa en

HeLa, debido a que no se cuenta con reportes que indiquen las afinidades de cada isoforma.

Enzima	Parámetro	AS-30D	HeLa	Enzima	Parámetro	AS-30D	HeLa
HK	V_{max}	0.46	0.06	GAPDH	V_{max}	1	1.9
	K_m GLU	0.18	0.1		K_m G3P	0.29	0.19
	K_m ATP	0.99	1.1		PGK	K_m NAD+	0.08
			V_{max}	27		12.9	
HPI	V_{max}	1.6	2.65		K_m G3P	ND	ND
	K_m G6P	0.48	0.34		K_m ADP	0.67	0.04
PFK-I	V_{max}	0.21	0.04	PGAM	V_{max}	20	0.59
	K_m F6P		0.59		K_m 3PG	0.18 (2)	0.19
	K_m ATP		0.04	ENO PYK	V_{max}	0.51	0.18
			K_m 2PG		0.16	0.04	
				V_{max}	6.6	1.6	
				K_m PEP	0.4	0.01	
ALDO	V_{max}	0.23	0.25	LDH	K_m ADP	0.3	0.28
	K_m F6BP	0.01	0.01		V_{max}	13.4	11.4
TPI	V_{max}	5.6	4.9		K_m PYR	0.13	0.28
	K_m DHAP	1.9	1.6		K_m NADH	ND	ND

Tabla 2. Velocidades máximas (V_{max}) directas y constantes de Michaelis - Menten (K_m) de las enzimas de la glucólisis determinadas en células HeLa. V_{max} , U/mg; K_m , mM. Los datos de V_{max} de AS-30D se tomaron de Marín-Hernández et al. (2006) y las K_m son datos no publicados de Marín-Hernández A. ND: No determinado. HK: hexocinasa, HPI: hexosafosfato isomerasa, PFK-1: fosfofructocinasa tipo 1, ALD: aldolasa, TPI: triosafosfato isomerasa, GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, PGK: fosfoglicetato cinasa, PGAM: fosfoglicerato mutasa, ENO: enolasa, PYK: piruvato cinasa, LDH: lactato deshidrogenasa, G6P: glucosa-6-fosfato, F6P: fructosa-6-fosfato, F-1,6-BP: fructosa-1,6-bifosfato, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, G3P: gliceraldehído-3-fosfato, 3PG: 3-fosfoglicerato.

Enzima	Parámetro	AS-30D	HeLa
HPI	V_{max}	1.6	2.65
	$K_m F6P$	0.1	0.093
ALD	V_{max}	0.233	0.037
	$K_m DHAP$	ND	ND
	$K_m G3P$	ND	ND
TPI	V_{max}	56	60
	$K_m G3P$	0.28	0.19
GAPDH	V_{max}	0.9	0.9
	$K_m NADH$	0.01	0.009
	$K_m 3PD$	0.9	0.35
PGK	V_{max}	4.3	3.8
	$K_m ATP$	0.15	0.27
	$K_m 3PG$	0.12	0.13
ENO	V_{max}	0.87	0.39
	$K_m PEP$	0.036	0.062

Tabla 3. Velocidades máximas (V_{max}) reversas y constantes de Michaelis (K_m) de las enzimas de la glucólisis determinadas en células HeLa. Los datos de V_{max} de AS-30D se tomaron de Marín-Hernández et al. (2006) y las K_m son datos no publicados de Marín-Hernández A. V_{max} , U/mg; K_m , mM.

	Parámetro	AS-30D	HeLa
GLUT	V_{max}	0.035*	0.015*
	K_m GLU	0.013*	0.9*

Tabla 4. Velocidades máximas (V_{max}) y constante de Michaelis (K_m) para el transportador de glucosa. * Datos tomados de Rodríguez-Enríquez et al. (2009). V_{max} , U/mg; K_m , mM.

Por otra parte, al hacer un análisis de las velocidades máximas y considerar el valor reportado para el GLUT se puede observar que tanto el GLUT como las enzimas HK y PFK-I presentan la menor V_{max} (0.015, 0.06 y 0.04 U/mg de proteína, respectivamente); estos datos sugieren que estas enzimas y el GLUT pueden ser responsables del control del flujo la vía debido a que al mantener una V_{max} baja, con respecto al resto, frenan el flujo de intermediarios en la glucólisis. Sin embargo, se esperaría que la velocidad del transportador y de las enzimas fuera aún más baja, considerando que una enzima bajo condiciones fisiológicas no se mantiene trabajando en condiciones de V_{max} (bajo concentraciones saturantes de sustratos y en ausencia de productos e inhibidores).

5.2 Inhibición de la HK por G6P

Con el fin de determinar si la HK que se expresaba en HeLa era inhibida por su producto la (G6P); se determinó la inhibición de la HK por la G6P en extractos celulares (Figura 10).

En la Figura 10 se observa que al incrementar la concentración de G6P disminuye la actividad de la HK y se calculó la concentración Inhibitoria media (CI_{50}) de 0.08 ± 0.04 mM cuyo valor es 3 veces más bajo con respecto al reportado para la HK de AS-30D ($CI_{50}=0.26$ mM) (Marín-Hernández et al., 2006). La concentración intracelular de G6P que se encuentra en células HeLa es de 0.6 mM (Marín-Hernández et al., 2006), que correspondería a 7.5 veces la CI_{50} , lo que sugiere la HK presente en HeLa podría contribuir importantemente en el control de la glucólisis debido a que es inhibida fuertemente. Como ocurre en las células AS-

30D en donde se reportó que la HK puede mantener un control de un 70% junto con el transportador, debido a que es inhibida fuertemente por la G6P, independientemente de encontrarse unida o libre en el citosol (Marín Hernández et al., 2006). En el caso de células HeLa no se caracterizó la inhibición de la HK unida a la mitocondria, debido a las dificultades técnicas para obtener mitocondrias.

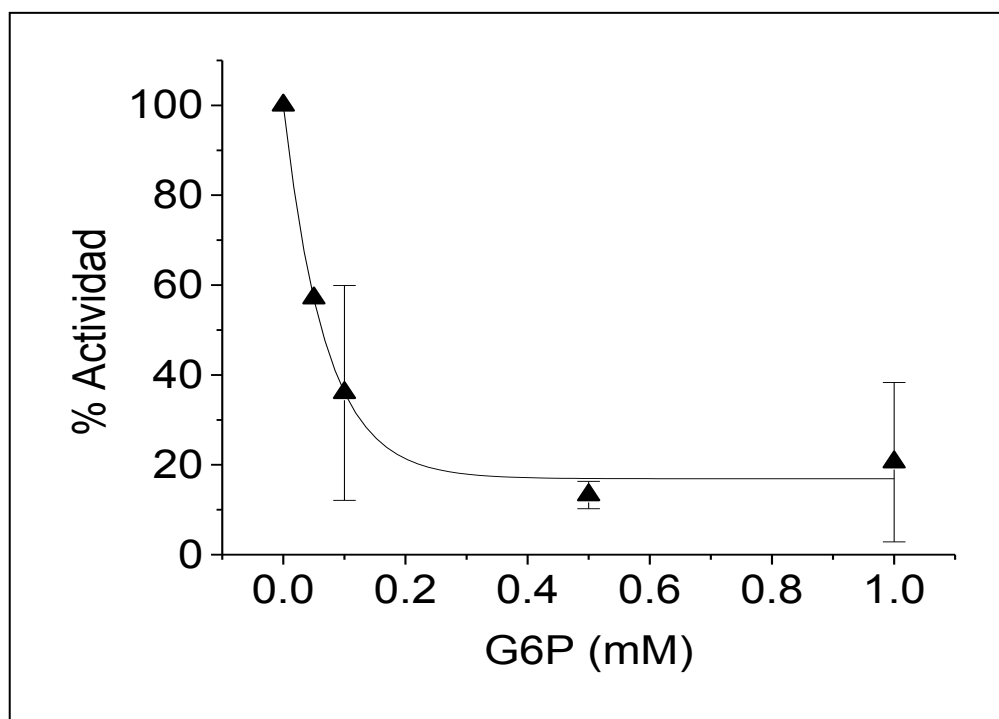


Figura 10. Inhibición de HK a diferentes concentraciones de G6P. Medio MOPS 50 mM pH 7, 3 min de incubación a 37 °C.

5.3 Activación PFK-1 por F-2,6-BP

Después de comprobar que la HK seguía siendo sensible a su inhibidor fisiológico G6P (Gráfico 3), se procedió a evaluar que ocurría con la PFK-I en presencia de su activador la F-2,6-BP. Para lo cual se midió la actividad de la PFK-I en presencia de diferentes concentraciones de F-2,6-BP (0 μ M a 50 μ M).

Como puede observarse en la Figura 11, la PFK-I presente en las células tumorales HeLa es sensible a su activador fisiológico F-2,6-BP, ya que a mayor concentración la actividad se incrementa.

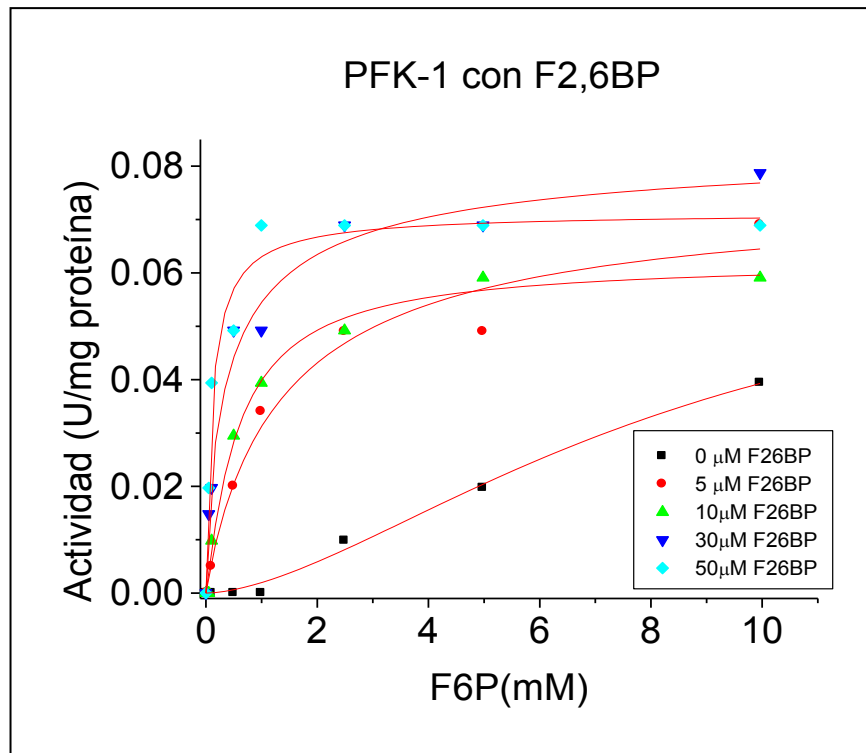


Figura 11. Activación de PFK-I a diferentes concentraciones de su activador F-2,6-BP. Medio MOPS 50 mM pH 7.0 a 37 °C.

Una vez comprobado el efecto activador de la F-2,6-BP sobre la PFK-I se procedió a realizar otro ensayo, en donde se mantuvo fija la concentración de F6P y se variaron las concentraciones de activador, con la finalidad de conocer la constante de activación aparente ($K_{0.5}$) y poder comparar la sensibilidad de la enzima de las células HeLa a la F-2,6-BP con respecto a la enzima presente en las células AS-30D, reportada por Marín – Hernández et al. 2006.

El experimento se realizó con dos concentraciones de F6P, 2.4 mM que corresponde a la concentración de F6P presente en AS-30D y con 0.4 mM que representa la concentración en HeLa, con la finalidad de poder comparar con lo reportado por Marín – Hernández et al. 2006 ($K_{0.5}$) y conocer el valor en condiciones fisiológicas de HeLa.

Al graficar la actividad de PFK-I obtenida en este experimento (calculada como se muestra en pág. 29 – 30) vs la concentración de F-2,6-BP se obtuvo la gráfica mostrada en la Figura 12 a partir de la cual se calculó la $K_{0.5}$ para ambas concentraciones de glucosa haciendo un ajuste de Michaelis - Menten en donde el valor de K_m corresponde a la $K_{0.5}$. Con lo anterior se obtuvo un valor de $K_{0.5} = 3.1 \mu\text{M}$ (1) para la concentración de F6P correspondiente a las células AS-30D que fue 3 veces menor al valor reportado por Marín-Hernández et al. 2006 de $0.96 \mu\text{M}$; lo que sugiere que la enzima en HeLa es menos sensible a la activación por F-2,6-BP que su contraparte en AS-30D. Lo anterior se hizo más evidente cuando se fijó la concentración de la F6P a 0.4 mM (concentración intracelular en HeLa) y se obtuvo una $K_{0.5}$ de $10.3 \mu\text{M}$ (1).

Los resultados obtenidos indican que la enzima PFK-I de las células HeLa requiere de más activador, por lo cual podría verse disminuida su actividad en presencia de citrato y ATP (inhibidores fisiológicos). Esto resulta importante porque la F-2,6-BP activa a la enzima e impide la inhibición que ejercen el citrato y el ATP en condiciones fisiológicas.

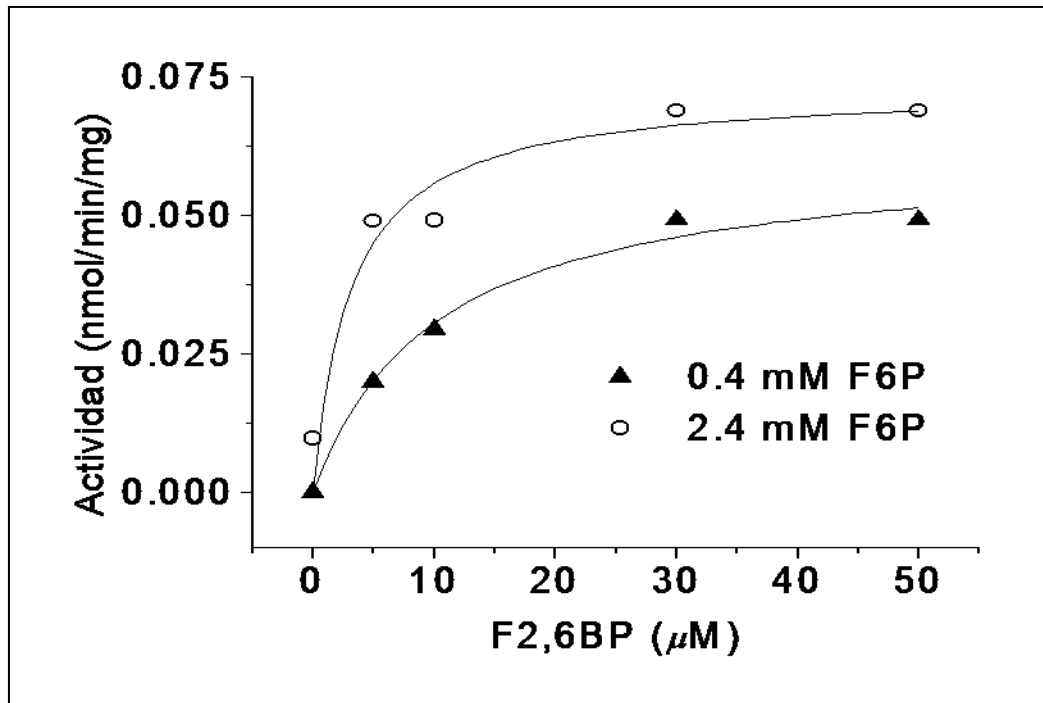


Figura 12. Actividad de PFK-I a concentraciones fijas de F6P, 0.4 mM y 2.4 mM, correspondientes a la concentración fisiológica en células HeLa y As-30D respectivamente. Medio MOPS 50 mM, pH 7.0, a 37 °C.

5.4 Flujos de la primera sección de la glucólisis

En base a los datos anteriores y para tener una mejor idea sobre lo que pasa in vivo, ya que bajo estas condiciones las enzimas se encuentran en presencia tanto de sus sustratos como de sus productos, se decidió medir los flujos a través del bloque de las enzimas de la parte alta de la glucólisis (HK, HPI, PFK-1, ALD y TPI).

El flujo a través del bloque HK-TPI no se detectó, lo cual pudo deberse a que la HK al estar inhibida fuertemente por la G6P, produjo poco sustrato para la HPI lo cual se refleja en un flujo muy bajo. Lo que concuerda con que el flujo a través del bloque PFK-I no se incrementa de manera importante. El flujo del resto de los bloques (HPI-TPI, PFK-1-TPI, ALD-TPI) fue detectable, siendo el flujo más lento el del bloque HPI-TPI, debido probablemente a que en este bloque de enzimas la PFK-1 es la que tiene la menor actividad. Mientras, que el flujo del bloque ALD-TPI fue el más rápido porque las actividades de la ALD y la TPI fueron mayores que las actividades de la HK y de la PFK-1. El siguiente paso fue medir la velocidad de glucólisis y la concentración de algunos metabolitos (G6P, F6P y ATP) (Tabla 6), cuyos valores fueron similares a los reportados previamente para esta línea celular (Marín-Hernández et al., 2006).

Enzimas	Flujo (nmol / min mg de proteína)	
	HeLa	PC-3
HK-TPI	N.D	N.D
HPI-TPI	26.67 (1)	48.24 ± 5.6 (3)
PFK-1-TPI	32.05 (1)	66.60 ± 18.9 (3)
ALD-TPI	65.63 (1)	223.83 ± 31.6 (3)

Tabla 5. Flujos de la primera sección de la glucólisis. Medio MOPS 50 mM, pH 7.0, 37 °C.

Al analizar los resultados obtenidos e incluir en este análisis los datos de nuestro grupo sobre el GLUT (Rodríguez-Enríquez et al., 2009) podemos establecer que el GLUT puede controlar la glucólisis en HeLa por presentar una afinidad baja por

glucosa y mantener la V_{max} más baja de la vía. Así mismo, la HK, también puede ser un punto de control importante ya que además de mantener una baja velocidad, es inhibida fuertemente por la G6P. En tanto, que la PFK-1 puede mantener un control importante dependiendo de dos cosas: de la concentración de F-2,6-BP y de la concentración de sus inhibidores fisiológicos (citrato y ATP). Por lo cual queda pendiente determinar la concentración intracelular de F-2,6B-P, de citrato y ATP.

Dada la posible distribución del control de la glucólisis en HeLa, se trató de hacer el mismo análisis con la línea tumoral PC-3 (células de cáncer de próstata), con el fin de establecer si las enzimas que en HeLa controlan podrían hacerlo también en otra línea tumoral. Tomando como referencia los resultados obtenidos en HeLa se midió la actividad de la HK y la PFK-1, los flujos de la primera sección de la glucólisis, la producción de lactato y la concentración de algunos intermediarios (G6P, ATP y F6P).

METABOLITO (mM)	HeLa	PC-3
G6P	1.9 (1)	2.8 ± 1.3 (3)
F6P	2.2 (1)	2.6 ± 1.4 (3)
ATP	6.6 (1)	13.2 ± 4.6 (3)

Tabla 6. Concentración de metabolitos presentes en las líneas celulares (mM).

Medio MOPS 50 mM, pH 7.0, 37 °C.

Se encontró que la V_{max} de HK fue menor que la de la PFK-I, por lo cual podría controlar el flujo glucolítico. Al medir los flujos de la parte alta de la glucólisis se encontró que el flujo del bloque HK-TPI no fue detectado, de forma similar a lo que

ocurrió en HeLa, lo que sugiere que su baja velocidad y la fuerte inhibición que ejerce la G6P la HK limitó el flujo de este bloque. En tanto que los bloques HPI-TPI y PFK-1-TPI mantuvieron un flujo semejante al encontrado en HeLa; la excepción fue el bloque ALD-TPI que presentó un incremento en el flujo de 3.5 veces. Este resultado sugiere que las actividades de la ALD y la TPI eran mayores en PC-3 que en HeLa, en cambio, el del resto de las enzimas (HK, HPI y PFK-1) era muy similar en ambos modelos tumorales. Sin embargo, la diferencia en el flujo del bloque ALD-TPI no conducía a un incremento en el flujo glucolítico ni en la concentración de G6P, F6P y ATP en PC-3.

Lo anterior nos indica que como en HeLa, la HK en PC-3 también podría controlar la glucólisis y que la PFK-1 dependiendo de la concentración de inhibidores y activadores podría o no contribuir en el control. En tanto que también podría considerarse que el GLUT podría contribuir en el control en ambos modelos tumorales; sin embargo, falta por evaluar la actividad de éste en PC-3.

ENZIMA	LINEA CELULAR	
	HeLa	PC-3
HK	58.7 ± 6.6 (5)	34.7 ± 1.8 (3)
PFK-I	47.6 ± 6.9 (3)	108.5 (2)

Tabla 7. Actividades enzimáticas en nmol/min*mg de proteína para la HK y PFK-I.

Medio MOPS 50 mM, pH 7.0, 37 °C.

El sugerir que en HeLa y PC-3 controlen el GLUT y la HK, coincide con que en las células tumorales AS-30D este transportador y la HK sean los principales sitios de control (Marín-Hernández et al., 2006). Las causas de que estos controlen en AS-30D, son las mismas que hemos considerado proponer en HeLa y son la baja velocidad del GLUT y la alta sensibilidad de la HK a la inhibición por G6P. Para validar nuestra propuesta sobre los principales puntos de control en HeLa y poder establecer el porcentaje en que controla cada uno (GLUT y HK), se propone la construcción de un modelo cinético que considere los parámetros cinéticos de cada enzima (determinados en este trabajo). Este modelo se construirá en el programa Gepasi, para lo cual se emplearán los datos de V_{max} de las reacciones directas y reversas, las afinidades tanto por sustratos y productos, las ecuaciones de velocidad correspondientes, las concentraciones de intermediarios, entre otra serie de parámetros y consideraciones.

VI. CONCLUSIONES

El control metabólico de la vía glicolítica en las células de cáncer cérvico-uterino HeLa y de próstata PC-3 probablemente se encuentre ejercido por el transportador de glucosa (GLUT) y la Hexocinasa (HK).

El control que puede ejercer la PFK-I en ambas líneas celulares está en función de la concentración de F-2,6-BP.

VII. PERSPECTIVAS

- Medir la velocidad máxima del transportador de Glucosa (GLUT) en las células PC-3.
- Determinar actividad de la HK unida a la membrana externa mitocondrial.
- Determinar las concentraciones intracelulares de F-2,6-P, citrato y ATP en las células HeLa y PC-3.
- Evaluar el efecto inhibitorio del citrato y del ATP sobre la actividad de la PFK-I.
- Construir un modelo cinético de la glucólisis de HeLa.

VIII. ABREVIATURAS

[S]: Concentración de sustrato.

1,3-BPG: 1,3-Bisfosfoglicerato.

2PG: 2-fosfoglicerato.

3PG: 3-fosfoglicerato.

AcetilCoA: Acetil coenzima A

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADP: Adenosín difosfato.

Ala: Alanina

ALD: Aldolasa.

AsO₄: Arsenito.

ATP: Adenosín trifosfato.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CoA: Coenzima A

CI₅₀: Concentración inhibitoria media.

Cys: Cisteína.

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato.

DMEM: Medio Eagle's Dulbeco's modificado.

DOC: Desoxicolato

DTT: Ditiotreitól.

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetra-acético.

EGTA: Ácido etilen-glicol-tetra-acético.

ENO: Enolasa.

-
- F-1,6-BP: Fructosa -1,6- bisfosfato.
- F-2,6-BP: Fructosa -2,6-bisfosfato.
- F6P: Fructosa-6-fosfato.
- FdG: ¹⁸Fluorodesoxiglucosa.
- Glicerol-3-P: Glicerol-3-fosfato
- G3P: Gliceraldehído-3-fosfato.
- G6P: Glucosa-6-fosfato.
- G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
- Glu: Glucosa
- GLUT: Transportador de glucosa.
- Gly: Glicina.
- GTP: Guanosín trifosfato.
- HIF-1: Factor de transcripción inducible por la hipoxia.
- HK: Hexocinasa.
- HPI: Hexosa fosfato isomerasa.
- HPV-18: Virus de papiloma Humano 18.
- INEGI: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
- K_a*: Constante de activación.
- K_{0.5}*: Constante aparente de activación.
- K_i*: Constante de inhibición.
- K_m*: Constante de Michaelis-Menten.
- LDH: Lactato deshidrogenasa.
- MOPS: Ácido 3-(N-Monrfolino)- propanosulfónico.

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida adenina

NADH: Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina.

NADP⁺: Dinucleótido fosfato nicotinamida adenina.

NADPH: Forma reducida del dinucleótido fosfato nicotinamida adenina.

PEP: Fosfoenol piruvato.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PFK: Fosfofructocinasa.

PGK: Fosfoglicerato cinasa.

PGM: Fosfoglicerato mutasa.

pH: Potencial de Hidrogeno.

PYK: Piruvato cinasa.

PMSF: Fluoruro metilfenilmetanosulfonil fluoruro.

Pi: Fosfato inorgánico.

PPi: Pirofosfato.

PPiPFK: Fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato.

PYR: Piruvato

Ser: Serina.

TPI: Triosa fosfato isomerasa.

*V*_{max}: Velocidad máxima.

α-GDH: Alfa glicerol fosfato deshidrogenasa.

ΔAbs: Cambio de Absorbencia.

Δt: Cambio de tiempo.

IX. ANEXO. COMPOSICIÓN DE MEDIOS EMPLEADOS

Medio Eagle's Dulbecco's modificado (DME)

COMPONENTE	g/L	COMPONENTE	g/L
L- arginina HCl	0.084	L-Lisina HCl	0.146
L-cisteina HCl	0.626	L-Metionina	0.03
L-glutamina	0.584	L-Fenilalanina	0.066
Glicina	0.03	L-Serina	0.042
L-Histidina HCl H ₂ O	0.042	L-Treonina	0.095
L-Isoleucina	0.105	L-Triptofno	0.016
L-Leucina	0.105	L-Tirosina 2Na H ₂ O	0.10379
L-Valina	0.094	Niacinamida	0.004
Cloruro de colina	0.004	Ácido D-Pantoneico hemiclórico	0.004
Ácido fólico	0.004	Piridoxal HCl	0.004
Inositol	0.007	Riboflavina	0.0004
Triamina HCl	0.004	Cloruro de Potasio	0.4
Cloruro de calcio anhidro	0.2	Cloruro de Sodio	6.4
Nitrato férrico 9H ₂ O	0.0001	Fosfato monobásico de sodio anhidro	0.109
Sulfato de Magnesio anhidro	0.0976	Glucosa	4.5
Rojo de fenol Na	0.0159	Ácido piruvico	0.11

Ringer-Krebs

NaCl 125 mM

KCl 5 mM

HEPES 25 mM

KH₂PO₄ 1.3 mM

CaCl₂ 1.4 mM

MgCl₂ 1mM

Se ajusta el pH a 7.4

Tris/HCl

Tris 25mM

Se ajusta el pH a 7.6

HEPES/EGTA

HEPES 50 mM

EGTA 1 mM

Se ajusta el pH a 7.4

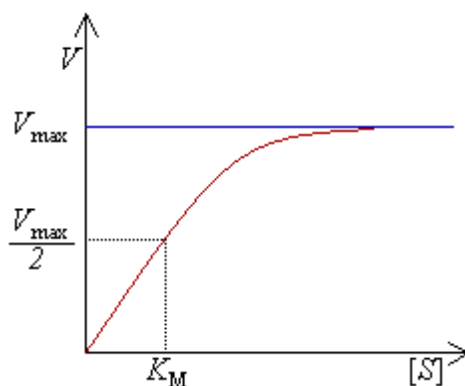
X. APÉNDICE

ECUACIÓN DE MICHAELIS - MENTEN

Michaelis y Menten establecieron la siguiente expresión matemática a fin de describir la cinética enzimática:

$$v_0 = V_{max} [S] / (K_M + [S])$$

Esta ecuación describe una hipérbola rectangular como la que se muestra a continuación en donde pueden ser localizados gráficamente, los parámetros cinéticos.



En donde V_{max} (velocidad máxima) es la velocidad de una reacción cuando la enzima se encuentra saturada de sustrato. La K_m (constante de Michaelis) se define como la cantidad de sustrato en la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima y el inverso representa la afinidad que tiene la enzima por el sustrato. v_0 (velocidad inicial) representa la velocidad inicial de la reacción cuando aun es lineal y antes de que la enzima sea inhibida por su producto.

XI. REFERENCIAS

Aguirre CL, Sotelo MJ. (2008) ***Tumores cerebrales***. Capitulo 7 “***Metabolismo energético y traducción de señales en tumores cerebrales***” Rodríguez-Enríquez S, Torres-Márquez M E, Marín Hernández A, Moreno Sánchez R. Editorial médica panamericana. 115-130.

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

Baena E, Gandarillas A, Vallespinós M, Zanet J, Bachs O, Redondo C, Fabregat I, Martínez-A C y Moreno Alborán I (2005). ***c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver***. Proc Natl Acad Sci USA. 102(20), 7286-7291.

Burt BM. et al. (2005) ***Using positron emission tomography with [¹⁸F]FDG to predict. Tumor behavior in experimental colorectal cancer***. Neoplasia (New York) 3, 189-195.

Bustamante E y Pedersen PL (1977) ***High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase***. Proc Natl Acad Sci USA 74, 3735–3739.

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

Dang CV & Semenza GL (1999) ***Oncogenic alterations of metabolism***. Trends Biochem Sci 24, 68–72.

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

Díaz-Rubio E y García Conde J (2000). ***Oncología Clínica Básica***. Ediciones ARÁN. España.

Dunaway GA, Kasten TP, Sebo T y Trapp R (1988) ***Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues***. Biochem J 251, 677–683.

Gambhir SS. (2002). ***Molecular imaging of cancer with positron emission tomography***. Nature Rev. Cancer 2, 683-693.

Gatenby R A y Gillies RJ.(2004) ***Why do cancers have high aerobic glycolysis?*** Nature reviews cancer 4. 891-899.

Gatenby, R.A. y Vincent, T.L. (2003) ***An evolutionary model of carcinogenesis***. Cancer Res. 63, 6212-6220.

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

González Barón M, Ordoñez A, Feliu J, Zamora P, Espinoza E y De castro J. (1998) ***Oncología Clínica: Fundamentos y Patología***. 2 Ed. Edit. McGraw-HILL. Interamericana. Madrid, España.

<http://www.inegi.gob.mx>

<http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cancersp/cancersp05.htm>

<http://www.atcc.org/>

<http://www.buenasalud.com/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=2936&ReturnCatID>

<http://www.geosalud.com/Cancerpacientes/cancerprostata2.htm>

http://www.tuotromedico.com/temas/cancer_de_prostata.htm

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

Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL. (2003) ***Overexpression of Glut-1 and increased glucose***

metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. Cancer 97, 1015-1024

Lauzier MC, Michaud MD, Déry MA, Richard DE. (2006). ***HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences*** Bull Cancer vol. 93, n° 4. 349-356.

Lubert Stryer (1993). ***Bioquímica.*** 3^{ra} ed. Edit. Reverté, Barcelona.

Marín-Hernández A, Rodríguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodríguez FL, Macias-Silva M, Sosa-Garrocho M & Moreno-Sanchez R (2006) ***Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an overexpressed but strongly product-inhibited hexokinase.*** FEBS J 273, 1975–1988.

Mazurek S, Michel A & Eigenbrodt E (1997) ***Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates.*** J Biol Chem 272, 4941–4952.

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

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

Mochiki E, Kuwano H, Katoh H, Asao T, Oriuchi N y Endo K. (2004). ***Evaluation of ^{18}F -2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer.*** World J. Surg. 28, 247-253.

Moreno - Sánchez R, Marín – Hernández A, Rodríguez – Enríquez S, Saavedra E (2007) ***Energy metabolism in tumor cells.*** FEBS J 274, 1393-1398.

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

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

Oskam R, Rijksen G, Staal GEJ & 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.

Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ.(2002). ***The myc oncogene: Marvelously Complex.*** Adv Cancer Res 84, 81-154.

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

Pardo Mindán FJ (1997). ***Anatomía patológica***. 2ed, edit. Barcelona: Mosby Doyma Libros.373.

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

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

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

Rapoport TA, Heinrich R, Jacobasch G. (1974), ***A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes***. Eur. J. Biochem. 42, 107-120.

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

Rodríguez-Enríquez S, Juárez O, Rodríguez-Zavala JS, Moreno-Sánchez R. (2001). **Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells.** Eur J Biochem. 268, 2512-2519.

Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R. (2009). **Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells.** J Cell Physiol. 221, 552-9

Romero Lira LC. (2000). **Evaluación antineoplásica de cuatro casiopeinas empleando líneas tumorales murinas y humanas.** Tesis. UNAM Facultad de Química.

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

Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H. (2001). **The metabolism of tumours: 70 years later.** Novartis Found. Symp. 240, 251-260

Staal GEJ, Kalff A, Heesbeen EC, Van Veelen CWM & Rijksen G (1987) **Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas.** Cancer Res 47, 5047–5051.

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

Vázquez-Ortiz G, Piña-Sánchez P, Hidalgo A, Lazos M, Moreno J, Alvarado II, Cruz F, Hernández DM., Pérez-Plascencia C, Salcedo M (2005). **Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados**. Revista de Investigación Clínica. Vol. 57, Núm. 3. 434-441.

Voet Donal. (1990). **Bioquímica**. Capítulo 13. Ediciones Omega. Barcelona.

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

Weber G (2001) **Ordered biochemical program of gene expression in cancer cells**. Biochemistry (Moscow) 66, 1164–1173.

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

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

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