



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS ENZIMAS
DEL CICLO DE KREBS EN MITOCONDRIAS DE
CÉLULAS TUMORALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

ISIS DEL MAZO MONSALVO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. ÁLVARO MARÍN HERNÁNDEZ
MAYO, 2014



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.

La presente tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, bajo la dirección del Dr. Álvaro Marín Hernández.

JURADO ASIGNADO

Presidente Dra. Sara Rodríguez Enríquez

Vocal Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Secretario Dr. Álvaro Marín-Hernández

Suplente Dra. Erika Chavira Suárez

Suplente Dr. José Salud Rodríguez Zavala

ASESOR Dr. Álvaro Marín-Hernández

SUSTENTANTE Isis Del Mazo Monsalvo

Dedicada a:

Sofia, Alfonso, Arune, Geovanni y Alex

Por caminar juntos en este camino.

Agradecimientos:

Al tutor de esta tesis, por su guía,
a los compañeros del laboratorio,
a todo el departamento de bioquímica.

Gracias por su apoyo, lecciones y experiencias, para que este esfuerzo se volviera realidad y a todas aquellas personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....8

RESUMEN.....12

1. INTRODUCCIÓN.....13

Sección I

1.1. El cáncer.....13

1.2. Metabolismo energético en células tumorales.....14

Sección II

1.3. El ciclo de Krebs.....18

1.4.El ciclo de Krebs en células tumorales.....24

Sección III

1.5. Cinética enzimática.....26

2. JUSTIFICACIÓN.....30

3. HIPÓTESIS.....	31
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos particulares.....	31
5. MATERIALES Y MÉTOS.....	32
5.1. Línea tumoral AS-30D.....	32
5.2. Aislamiento de mitocondrias.....	32
5.2.1. AS-30D.....	32
5.2.2. Hígado.....	34
5.3. Determinación de actividades enzimáticas.....	36
5.3.1. Citrato sintasa.....	36
5.3.2. Aconitasa <i>forward/reverse</i>	37
5.3.3. Isocitrato deshidrogenasa $NAD^+ICDH/NADP^+ICDH$	38
5.3.4. 2-oxoglutarato deshidrogenasa.....	39
5.3.5. Succinato deshidrogenasa.....	39
5.3.5. Fumarasa <i>forward/reverse</i>	40
5.3.6. Malato deshidrogenasa <i>forward/reverse</i>	40
5.4. Determinación de parámetros cinéticos.....	42
Cálculo de velocidad.....	42

6. RESULTADOS.....	43
6.1. Caracterización cinética.....	43
6.1.1. Aconitasa.....	43
6.1.2. Isocitrato deshidrogenasa.....	45
6.1.3. Succinato deshidrogenasa.....	45
6.2. Parámetros cinéticos de cada una de las enzimas del ciclo de Krebs.....	47
6.2.1. Afinidades.....	47
6.2.2. Velocidades máximas.....	47
6.2.3. Eficiencias catalíticas.....	48
7. DISCUSIÓN.....	52
8. CONCLUSIÓN.....	54
9. PERSPECTIVAS.....	54
10. REFERENCIAS.....	55

ABREVIATURAS

20GDH	2-oxoglutarato deshidrogenasa
2OG	2-oxoglutarato
AAT	Aspartato amino transferasa
AC	Aconitasa
AcCoA	Acetil coenzima A
ACM	Análisis de control metabólico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
Ca²⁺	Calcio
Ci	Citrato
CK	Ciclo de Krebs
CO₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
CoA-SH	Coenzima A forma reactiva
CS	Citrato sintasa
CTE	Cadena transportadora de electrones
DCPIP	2,6-diclorofenolindofeno
DTNB	5', 5'-ditiobis 2- ácido nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FADH	Flavín adenín dinucleótido, reducido

FH	Fumarasa, fumarato hidratasa
FO	Fosforilación oxidativa
Fum	Fumarato
GDP	Guanosín difosfato
GLUT	Transportador de glucosa
GTP	Guanosín trifosfato
HIF	<i>Hipoxia inducible factor</i> , factor inducido por hipoxia
HIFβ	<i>Hipoxia inducible factor</i> , factor inducido por hipoxia, sub unidad beta
HIF1α	<i>Hipoxia inducible factor</i> , factor inducido por hipoxia, sub unidad alfa
HK	Hexocinasa
HKE	HEPES 10 mM, KCl 100 mM, EDTA1 mM, pH 7.4
HPI	Hexosa fosfato isomerasa
HRE	<i>Hipoxia response element</i> , elemento de respuesta a hipoxia
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
IRP1	<i>Iron regulatory protein 1</i> , proteína reguladora de hierro
Isocit	Isocitrato
K_a	Constante de activación
K_i	Constante de inhibición
Mal	Malato
MDH	Malato deshidrogenasa
MED. \pm D.E.	Media \pm desviación estandar
mg	Mili-gramo

Mg²⁺	Magnesio
MgCl₂	Cloruro de magnesio
mL	Mili-litro
mM	Mili-molar
Mn²⁺	Manganeso
MnCl₂	Cloruro de manganeso
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotide, reducido
NAD⁺-ICDH	Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺
NADP⁺-ICDH	Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP ⁺
ND	No determinado
ngAtO	Nano-gramo átomo de oxígeno
ngAtO min mig	Nano-gramo átomo de oxígeno por minuto por miligramo de proteína
NKT	NaCl 150 mM, KCl 5mM y Tris/HCl 10mM, pH 7.4
nm	Nano-metro
nmol/min*mg	Nano-mol por minuto por miligramo de proteína
NR	No reportado
NTB	4-nitrobenzenethiol
OAA	Oxaloacetato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PFK	Fosfofructocinasa
PFK-1	Fosfofructocinasa-1

PMS	Fenazina metofulfato
RLM	Rat Liver Mitochondria, mitocondria de hígado de rata
SCS	Succinil Coenzima A Sintetasa
SDH	Succinato deshidrogenasa
SHE	Medio para centrifugación diferencial. Sacarosa 250mM, HEPES 10mM y EGTA 1mM, pH 7.4
Succ	Succinato
TPP	<i>Tiamine pyrophosphate</i> , coenzima pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa
U	Unidad Internacional, definida por la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto.
UV	Ultra violeta
$V_m f$	Velocidad máxima <i>forward</i>
$V_m r$	Velocidad máxima <i>reverse</i>
ΔAbs	Delta de absorbancia (cambio, diferencia)
Δt	Delta de tiempo en segundos (cambio, diferencia)
$\epsilon \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Coeficiente de extinción molar

RESUMEN

El aporte de ATP que proviene de la fosforilación oxidativa (FO) es > 80% en las células tumorales (Moreno-Sánchez *et al.* 2009) siendo los principales sitios de control de esta ruta metabólica, la NADH⁺ deshidrogenasa de la cadena respiratoria (40%) y las vías consumidoras de ATP (30%) (Rodríguez-Enríquez *et al.* 2000); sin embargo, no se ha evaluado el control que ejercen en esta ruta metabólica las enzimas del ciclo de Krebs (CK). En un avance para dilucidar otros sitios de control y posibles sitios terapéuticos en las vías de síntesis de ATP, se analizaron, la velocidad máxima (V_m ¹), la afinidad (K_m ²) y la eficiencia catalítica (V_m/K_m)³ de las enzimas: citrato sintasa (CS), aconitasa (AC), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH), succinato deshidrogenasa (SDH), malato deshidrogenasa (MDH), y fumarasa (FH) en mitocondrias del tumor AS-30D, comparando los parámetros cinéticos con mitocondrias de hígado de rata (RLM).

En las enzimas ensayadas, las velocidades máximas (V_m) fueron significativamente mayores en el tumor (1.8-5 y hasta 20 veces) respecto a RLM, pero las afinidades (K_m) por cada uno de sus sustratos fueron muy parecidas en los dos tipos de mitocondria y similares a las reportadas en la literatura. En ambos tipos de mitocondrias la V_m/K_m reveló que las enzimas catalíticamente menos eficientes fueron MDH, NAD-ICDH y 2OGDH, las cuales podrían ser sitios de control del ciclo de Krebs. Con los datos cinéticos obtenidos se está construyendo un modelo matemático para la identificación de otros posibles blancos terapéuticos en los tumores dependientes del metabolismo oxidativo

¹ Velocidad alcanzada con sustrato saturante en ausencia de producto.

² Concentración a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima, valor inverso de afinidad de la enzima por su sustrato.

³ Eficiencia catalítica. Capacidad de la enzima de transformar el sustrato en producto.

1. INTRODUCCIÓN

Sección I

1.1. El cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2008 estimó que la principal causa de muerte es el cáncer con 7.6 millones de casos a nivel mundial y calculó que el número de casos aumentará hasta 13.1 millones de defunciones en los próximos 15 años (Globocan, 2008; IARC, 2010). En México, los tipos de cáncer que causan mayor número de defunciones anuales en mujeres son el de mama (7.6 %), ovario (6.4%) y cuello del útero (2.7%); mientras que en hombres son el de próstata (8.1%) y vías respiratorias (tráquea, bronquios y pulmón, con 7%) (INEGI, 2008).

El cáncer es una enfermedad multifactorial donde el control de la proliferación y la diferenciación celular se pierde debido a la alta tasa de mutaciones inducidas por la exposición a la radiación, a los compuestos químicos y a algunos virus oncogénicos. En consecuencia, la célula normal se transforma en un tumor (Vogelstein y Kinzler, 2004; Tysnes y Bjerkvig, 2007; Romero-García *et al.*, 2011). La tumorigenesis involucra la activación de oncogenes como HER2, Src, H-RAS, c-MYC y la inactivación de genes supresores de tumores como PTEN, p53 y pRb que intervienen en la regulación del ciclo celular y en la proliferación (Vogelstein & Kinzler, 2004; Gillies *et al.*, 2008).

Las células tumorales desarrollan características distintivas durante y hasta su transformación como son: 1) potencial ilimitado de replicación; 2) angiogénesis sostenida; 3) evasión de la apoptosis; 4) cambios en la sensibilidad a señales de crecimiento y de no-crecimiento, 5) inducción de metástasis (invasión de tejidos); 6) evasión del sistema

inmune y 7) reprogramación del metabolismo energético (Hanahan y Weinberg, 2011; Romero-García *et al.*, 2011).

Las terapias tradicionales contra el cáncer (radioterapia y quimioterapia) tienen como blanco proteínas y vías de señalización que tienen las células en acelerada proliferación. Sin embargo, las células tumorales co-existen con células sanas. Entre las células sanas, las epiteliales y hematopoyéticas comparten la acelerada proliferación siendo susceptibles al daño inducido por el tratamiento. (Denekamp, 1980). Por lo tanto, se pone atención en el desarrollo de terapias más selectivas contra el cáncer basado en las diferencias entre las células tumorales y las sanas (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). En este sentido, la reprogramación en el metabolismo energético (glucólisis y fosforilación oxidativa) en respuesta a fluctuaciones en la disponibilidad del oxígeno y nutrientes es una característica distintiva en las células tumorales. Recientemente, se han desarrollado terapias novedosas que se enfocan en la identificación de las enzimas o proteínas involucradas en dichos cambios para proponerlas como nuevos blancos terapéuticos (Marín-Hernández *et al.*, 2009; Romero-García *et al.*, 2011).

1.2. Metabolismo energético en las células tumorales

La acelerada proliferación celular y la formación de vasos sanguíneos frágiles y caóticos durante el desarrollo de un tumor sólido (fig.1.), generan zonas donde los niveles de oxígeno y otros nutrientes (principalmente, la glucosa) son limitados (Onozuka *et al.*, 2011), en consecuencia co-existen dos poblaciones celulares cuya dependencia energética dependerá de su ubicación en el tejido tumoral: en aquellas zonas hipóxicas predominan las

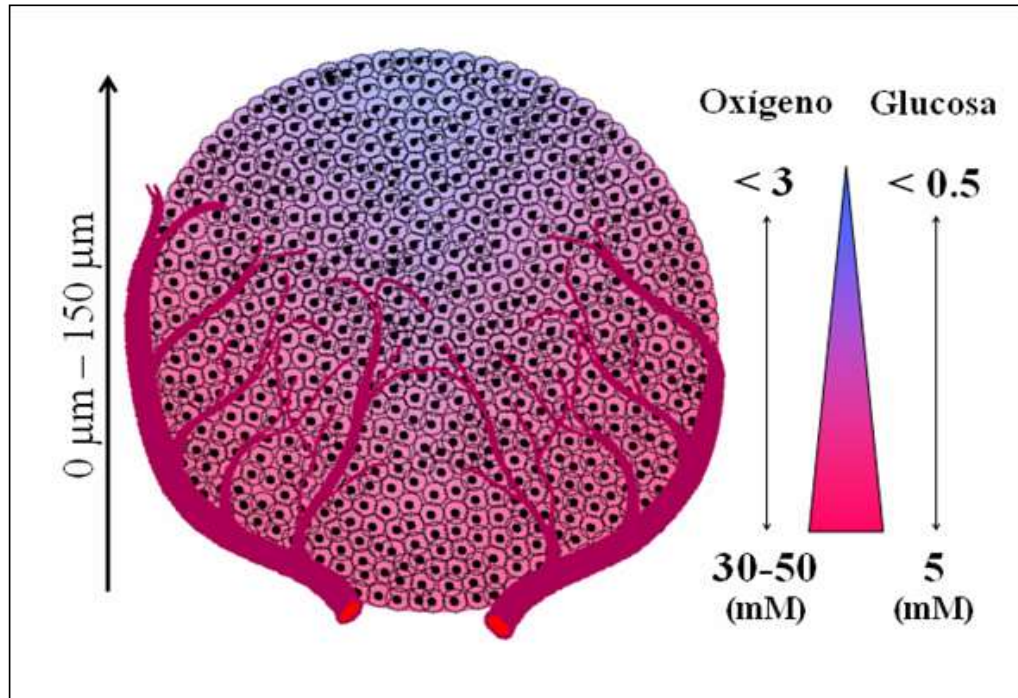


Fig. 1. Gradientes de oxígeno y glucosa en un tumor sólido. En función de la distancia del tumor a los vasos sanguíneos.

células dependientes del metabolismo glucolítico, mientras que las poblaciones cercanas a los vasos sanguíneos dependen principalmente de la fosforilación oxidativa (FO) para el suministro de ATP (Sonveaux *et al.*, 2008). Independiente de los diversos cambios a nivel genético y de transducción de señales, la célula tumoral depende de la glucólisis o fosforilación oxidativa para obtener ATP. Por lo que el estudio del metabolismo energético tumoral puede ser útil en el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas. En este sentido, las células tumorales presentan generalmente un aumento en la velocidad de la glucólisis en normoxia (efecto Warburg), con respecto a las células normales. Al parecer la activación de oncogenes (c-MYC, H-RAS) o del factor inducido por hipoxia (HIF-1 α) (Dang *et al.*, 1997) son los responsables de aumentar la sobre-expresión e incremento de la actividad de la mayoría de las enzimas y transportadores de la glucólisis (GLUT 1, GLUT 3, HKI, HKII, PFK-1, ALD-A, ALD-C, PGK1, ENO- α , PYK-M2, LDH-A y PFKF) (Marín-Hernández *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, en la célula tumoral se suscitan cambios en los mecanismos de regulación de las enzimas que ejercen el control en su glucólisis (hexocinasa, HK y fosfofructocinasa, PFK-1). (Marín-Hernández *et al.*, 2011).

La hipótesis de Warburg en 1956 promovió el supuesto de que el aumento del flujo glucolítico serviría para compensar un déficit mitocondrial (Warburg, 1956). Sin embargo, experimentalmente diversas líneas celulares de cáncer de roedor (AS-30D, Ehrlich Letreé fibrosarcoma y cáncer epitelial de mama 1929) y humanas (colon HT29, carcinoma de pulmón de Lewis, cáncer de mama MCF-7, cáncer de cervix, HeLa) (Sauer, 1977; Lanks y Li, 1988; Kallinowski *et al.*, 1989, Gauthier *et al.*, 1990; Miralpeix *et al.*, 1990; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2006)) mantienen (i) elevada su velocidad de respiración con respecto a su tejido de origen (de 1.5 a 2.3 veces mayor). y (ii) mantienen sobre-expresadas varias

proteínas mitocondriales como la enzima málica, la glutaminasa y algunas enzimas del ciclo de Krebs (Baggetto, 1992, Dietzen y Davis, 1993; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007).

La aplicación del Análisis de Control Metabólico (ACM) permitió la identificación de posibles sitios de control de la glucólisis así como de la FO y su contribución cuantitativa al control ejercido sobre el flujo (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). Una enzima que ejerce mayor control en un flujo metabólico se puede identificar como aquella que con una pequeña variación en su actividad afecta importantemente el flujo de la vía en la que se encuentra; por tanto, las enzimas reguladoras podrían ser consideradas como blancos terapéuticos. Con el ACM, se demostró que los puntos de control principales en la glucólisis tumoral son el transportador de glucosa (GLUT), la hexocinasa (HK) y la hexosa fosfoisomerasa (HPI) (Marín-Hernández *et al.*, 2009); mientras que para la FO el Complejo I (la NADH-Q -ubiquinona o plastoquinona- oxidoreductasa) de la cadena transportadora de electrones y las reacciones consumidoras de ATP (proliferación, sistemas de transporte, biosíntesis de macromoléculas) son las que ejercieron mayor control (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000). Sin embargo en este estudio no se analizó el control ejercido por cada una de las enzimas del ciclo de Krebs. De hecho se ha demostrado que en algunos tumores ascíticos como el hepatoma AS-30D, la actividad de la mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs está aumentada de manera significativa (de 1.5 a 8.5 veces) (Dietzen y Davis, 1993). Por lo tanto, la identificación de la o las enzimas del ciclo de Krebs que presenten diferencias cinéticas con respecto a su tejido de origen podrían también ser considerados como potenciales sitios terapéuticos.

Sección II

1.3. El ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs forma parte del sistema oxidativo de la FO. Entre sus funciones principales se encuentra (i) la generación de poder reductor (NADH) utilizado por el sitio I de la cadena transportadora de electrones. La oxido-reducción de este sustrato promueve un transporte vectorial de electrones entre los complejos respiratorios y un bombeo de protones del complejo I, II y III de la matriz al espacio intermembranal. Este gradiente de protones es sustrato de la ATP synthase (o ATP sintasa) para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato; (ii) síntesis de precursores para la formación de aminoácidos y de colesterol y ácidos grasos para la biosíntesis de membranas celulares (Müller-Esterl, 2008). El ciclo de Krebs consta de ocho enzimas localizadas en su mayoría en la matriz mitocondrial (Fig.2) excepto la succinato deshidrogenasa que se encuentra en la cara interna de la membrana interna mitocondrial (Nelson *et al.*, 2008; Müller-Esterl, 2008; Norris, 1971; Rogers *et al.*, 2009). En la Tabla 1 se resumen la localización y las isoformas de cada una de las enzimas que componen al ciclo de Krebs.

Citrato sintasa (CS). Condensa al oxaloacetato y al acetil coenzima A para la formación de citrato. El valor de ΔG° para esta reacción es de -31.5 KJ/mol resultando una reacción exergónica e irreversible. La enzima es un homodímero que se encuentra únicamente en la matriz mitocondrial, razón por la que es utilizada como marcador de daño mitocondrial. Su actividad es inhibida por ATP, NADH y por derivados de ácidos grasos.

Aconitasa (AC). En reacción hacia adelante, la enzima isomeriza al citrato para transformarlo en isocitrato. La enzima en su sitio activo posee un grupo hierro-azufre que

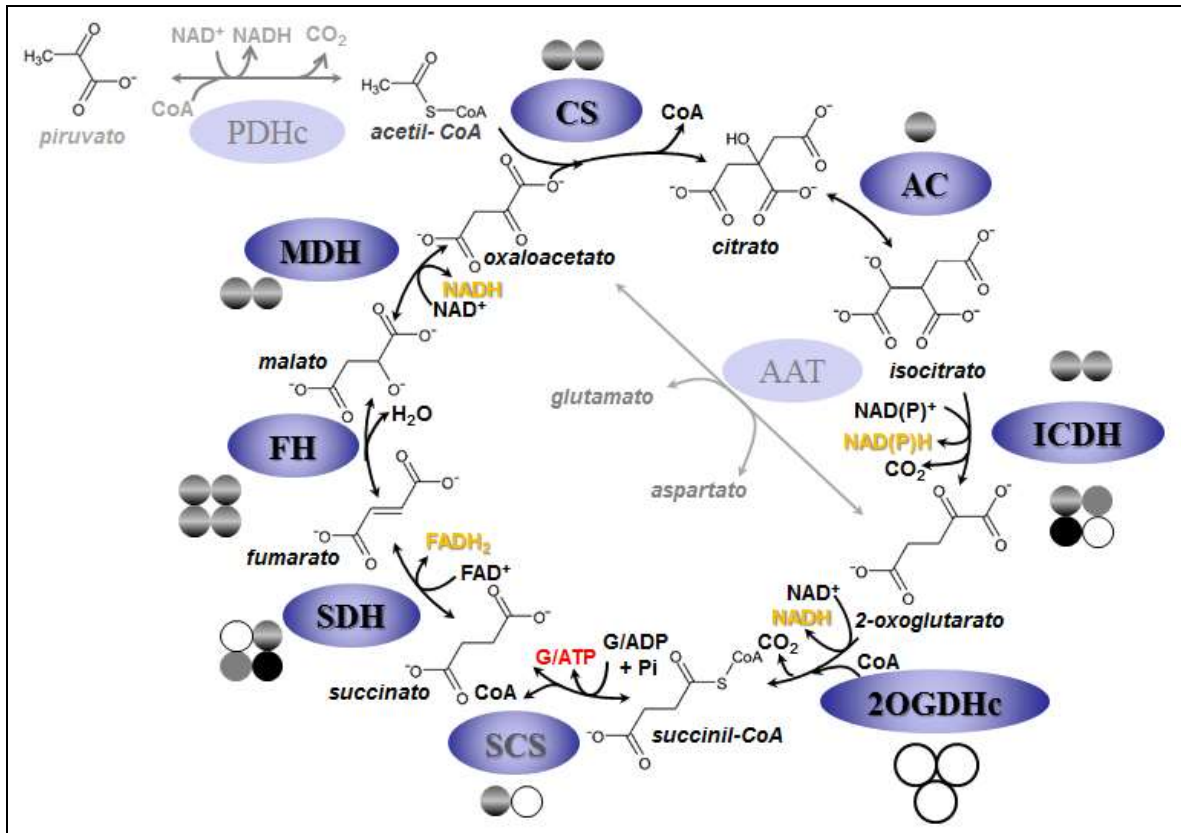


Figura 2. El ciclo de Krebs. PDH, piruvato deshidrogenasa; AAT, transaminasa glutamato-aspartato (aspartato amino transferasa); CS, citrato sintasa; AC, aconitasa; IDH, isocitrato deshidrogenasa, 2OGDH, 2-oxoglutarato deshidrogenasa; SCS, succinil coenzima A sintetasa; SDH, succinato deshidrogenasa; FH, fumarasa; MDH, malato deshidrogenasa.

es altamente sensible a oxígeno por lo que es usada como un marcador de estrés oxidativo. Además, se sugiere como sensor intramitocondrial del estado redox (balance entre el estrés oxidativo y las defensas antioxidantes). El valor de $\Delta G'^{\circ}$ para esta reacción es de 5 KJ/mol.

Isocitrato deshidrogenasa (ICDH). Esta enzima es considerada como uno de los principales puntos de control del ciclo de Krebs en células normales, ya que tiene regulación alostérica (Rogers A., Gibon Y., 2009). Tiene como activadores al ADP, el Ca^{2+} , al Mg^{2+} , al Mn^{2+} y al citrato, y como inhibidores al 2-oxoglutarato, al NADH y al ATP. La reacción que cataliza es la descarboxilación del isocitrato con la formación de 2-oxoglutarato, junto con la reducción de NAD^+ a NADH; esta reacción en mamíferos es irreversible ($\Delta G'^{\circ}$ -21 KJ/mol). Existen tres isoformas de la enzima: dos dependientes de NADP^+ (ICDH 1 y 2, homodímeros) que se encuentran en el citosol y la matriz mitocondrial respectivamente y una dependiente de NAD^+ (ICDH 3) que se encuentra como heterotetrámero en la matriz mitocondrial. El gen de esta isoforma presenta *splicing* alternativo del cual se obtienen tres productos (Voet & Voet, 1995; Reisch y Elpeleg, 2007, Müller-Esterl, 2008; Chen y Zheng, 2008).

2-oxoglutarato deshidrogenasa (2OGDH). Es un complejo multienzimático que consiste de múltiples copias de tres subunidades: la oxoglutarato descarboxilasa dependiente de TPP (E1), la enzima núcleo dihidrolipil succinil-transferasa (E2), y la dihidrolipoil deshidrogenasa (LAD, E3). Esta última presente también en el complejo de la PDH (piruvato deshidrogenasa). En particular, la oxoglutarato descarboxilasa dependiente de TPP, se inactiva por especies reactivas de oxígeno que en ocasiones, ella misma produce. La 2OGDH cataliza la descarboxilación del 2-oxoglutarato en succinil CoA y NADH con un $\Delta G'^{\circ}$ de -33 KJ/mol. Es una enzima altamente regulada activada

principalmente por Ca^{2+} , e inhibida por NADH y succinil-CoA (Voet y Voet, 1995; Reisch y Elpeleg, 2007, Müller-Esterl, 2008).

Succinil coenzima A sintetasa (SCS). La enzima SCS utiliza succinil-CoA (un tioéster de alta energía con un ΔG° de hidrólisis de -33.5 KJ/mol) para fosforilar ADP o GDP. Existen dos isoformas mitocondriales de este heterodímero (compuesto por subunidades α y β), una isoforma que fosforila ADP (SCS-A) y otra que fosforila GDP (SCS-G). Al parecer su especificidad depende de la subunidad β . Se propone que la SCS-A favorece la reacción en sentido hacia adelante (*forward*), mientras que la SCS-G cataliza la reacción en sentido inverso (*reverse*). La isoforma SCS-A se encuentra preferentemente en tejidos anabólicos como hígado y riñón; y la isoforma SCS-G se encuentra en tejidos catabólicos como testículos y cerebro (Voet y Voet, 1995; Reisch y Elpeleg, 2007, Müller-Esterl, 2008).

Succinato deshidrogenasa (SDH). Este complejo enzimático (conocido también como el complejo II, succinato-ubiquinona óxido reductasa), se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial (subunidades hidrofílicas A y B; subunidades hidrofóbicas C y D) orientada hacia la matriz mitocondrial. Este complejo tiene una participación dual en el CK y en la cadena transportadora de electrones donde la oxidación del succinato a fumarato (con un ΔG° de 6 KJ/mol) provee de un par de electrones por la oxidación del FADH_2 (complejo II) a la poza de quinonas (Reisch y Elpeleg, 2007, Müller-Esterl, 2008).

Fumarasa (FH). Esta enzima cataliza la oxidación de fumarato a malato ($\Delta G^\circ = -3.4$ KJ/mol). Existen dos isoformas, una mitocondrial y otra citosólica, ambas producto de un solo gen a través de *splicing* alternativo. Se propone que la versión citosólica puede

contribuir al ciclo de la urea y en el metabolismo de aminoácidos (Reisch y Elpeleg, 2007; Yogev *et al.*, 2011)

Malato deshidrogenasa (MDH). Esta enzima interviene en la oxidación del malato a oxaloacetato. Conforma un homotetrámero y tiene dos isoformas, una mitocondrial y otra citosólica; ambas forman parte de la lanzadera malato/aspartato. Por el ΔG° (+29.7 KJ/mol) de esta reacción se favorece la reacción en el sentido inverso o *reverse*. (oxaloacetato/NADH \rightarrow malato/NAD⁺) (Reisch y Elpeleg, 2007; Müller-Esterl, 2008).

Tabla 1. Isoformas de las enzimas del ciclo de Krebs.

<i>Enzima</i>	<i>Isoformas</i>	<i>Localización</i>	<i>Estado de oligomerización</i>
Citrato sintasa	Ninguna	Matriz mitocondrial	Homodímero
Aconitasa	AC (IRP-3)	Matriz mitocondrial	Monómero
	IRP1 (AC1), IRP2 (AC3) (proteína reguladora de hierro-1 y 2)	Citosol	
Isocitrato deshidrogenasa	ICDH1 (dependiente de NADP ⁺)	Citosol	Homodímero
	ICDH2 (dependiente de NADP ⁺)	Matriz mitocondrial	Homodímero
	ICDH3 (dependiente de NAD ⁺)		Heterotetrámero
2-Oxoglutarato deshidrogenasa	Ninguna	Matriz mitocondrial	Complejo multienzimático (3 enzimas)
Succinil CoA sintetasa	SCS-A (dependiente de ATP)	Matriz mitocondrial	Heterodímero
	SCA-G (dependiente de GTP)		
Succinato deshidrogenasa	Ninguna	Embebido en la membrana interna mitocondrial	Complejo enzimático (4 subunidades)
Fumarasa	FH1	Matriz mitocondrial	Homotetrámero
	FH2	Citosol	
Malato deshidrogenasa	MDH1	Citosol	Homodímero
	MDH2	Matriz mitocondrial	

Voet & Voet (1995); Reisch y Elpeleg (2007); Chen y Zheng (2008); Yogev *et al.* (2011), NCBI Gene (2013).

1.4. El ciclo de Krebs en células tumorales

Diversos grupos de investigación en cáncer consideraron el ciclo de Krebs en células tumorales no funcional. Esta suposición se apoyó por las siguientes evidencias experimentales: 1) la mayor parte del piruvato proveniente de la glucólisis es desviado hacia la producción de lactato (y no entra al CK) debido a que la PDH es inhibida por acetoina (Baggeto, 1992); 2) una elevada expulsión de citrato de la mitocondria al citosol, por ejemplo, el hepatoma Morris 3924A, expulsa 4 veces más rápido el citrato que el hígado normal. (Parlo & Coleman, 1984); y 3) a mutaciones en algunas de las enzimas del ciclo (SDH, FH e IDH) (Cardaci & Ciriolo, 2012). Sin embargo, en algunos modelos de células tumorales se demostró que el ciclo de Krebs es funcional (Dietzen & Davis en 1993) pero con algunas diferencias, por ejemplo, parte de los intermediarios del ciclo, provienen principalmente de la glutaminólisis, en lugar de que la fuente sea el piruvato producido en la glucólisis. La glutamina, el sustrato preferentemente consumido por las células tumorales, dentro de la mitocondria es deaminada a glutamato por la glutaminasa, el glutamato es transaminado por la glutamato deshidrogenasa a 2-oxoglutarato, intermediario del CK, en el cual es oxidado por medio de la 2OGDH, SCS, SDH, FH y MDH (Baggeto, 1992).

Las células tumorales de proliferación continua requieren de macromoléculas para mantener dicha proliferación. Esto se logra con la formación de precursores a partir de la generación de intermediarios. Lo anterior no es posible con un ciclo truncado. Lo que es cierto, es que en algunos tipos de tumores, como en cáncer renal de células papilares y paragangliomas de cabeza y cuello; se han reportado mutaciones en algunas enzimas del

ciclo de Krebs como la succinato deshidrogenasa (SDH), la fumarasa (FH) y la isocitrato deshidrogenasa (IDH) (Pollard, *et al.*, 2003; Turcan, *et al.*, 2012) que detienen el ciclo en diferentes etapas. Las mutaciones de SDH y FH producen una pérdida parcial o completa de la función, lo cual conduce a la acumulación de sus sustratos (succinato y fumarato), dichos metabolitos actúan como inhibidores de las prolil-hidroxilasas. Normalmente las prolil-hidroxilasas hidroxilan a HIF-1 α que es ubiquitinado y degradado por el proteosoma. Por lo tanto la acumulación de estos metabolitos al estabilizar HIF-1 α propician una pseudo-hipoxia. El factor transcripcional se une a elementos de respuesta a hipoxia, desencadenando el incremento de la glucólisis (Marín-Hernández, *et al.* 2009). Otras mutaciones carcinogénicas son las halladas en la isocitrato deshidrogenasa, algunas de las cuales son suficientes para establecer el fenotipo del glioma hipermetilador. (Turcan, *et al.*, 2012).

Por otra parte, aunque no se tienen reportes sobre si en las mitocondrias tumorales se expresan isoformas específicas de las enzimas del ciclo, como ocurre para la glucólisis, se ha observado un incremento en la actividad de la mayoría de las enzimas de la vía, entre 1.5 a 8.5 veces con respecto a la actividad que se observa en mitocondrias de tejidos normales (Tabla 2). Lo anterior correlaciona con un aumento en el flujo de la vía de 6 veces (Dietzen & Davis, 1993). De manera interesante, la IDH y la 2OGDH, enzimas consideradas como los principales puntos de control en el ciclo de Krebs en células normales (Müller-Esterl, 2008), incrementan su actividad (1.5-8.5 veces) (Tabla 2). Además la membrana externa mitocondrial tumoral contiene más colesterol respecto a las membranas de mitocondrias no tumorales (Baggeto, 1992). El colesterol rigidiza la membrana, lo que la hace menos permeable y permitiendo la acumulación de iones, algunos de estos como el Ca²⁺ y el Mg²⁺ son activadores muy potentes de la ICDH y

2OGDH, (Dietzen y Davis, 1993). Esta información sugiere que ambas enzimas pueden ser muy activas y no limitar el flujo del ciclo como ocurre en células normales (en las cuales son controladoras del flujo). Si las enzimas limitantes del CK en células tumorales son distintas a las enzimas de células no tumorales, entonces la distribución del control del flujo también será diferente. Por lo que establecer cuáles son los principales sitios de control en el ciclo de Krebs tumoral permitiría proponer nuevos sitios terapéuticos. Para ello se puede determinar el grado de control que ejerce cada una de las enzimas de la vía a través de un modelado cinético, que se construye a partir de los parámetros cinéticos (K_m , V_m) de cada una de las enzimas que componen la ruta metabólica. Como primer paso en la construcción del modelo del ciclo de Krebs, en la presente tesis se caracterizó cada una de las enzimas de esta vía en mitocondrias tumorales. Así mismo, a partir de los valores de los parámetros cinéticos se determinaron las eficiencias catalíticas (V_m/K_m) y se realizó la predicción de las enzimas que podrían controlar el flujo de la vía, al presentar menor eficiencia.

Sección III

1.5. Cinética enzimática

La actividad de una enzima es efectuar catálisis. La velocidad de catálisis dependerá de la cantidad de enzima activa y las concentraciones de metabolitos cuyo papel sea el de activadores, inhibidores y/o sustratos. La velocidad máxima V_m , de la enzima, es la velocidad que alcanza en condiciones de sustrato saturante, en presencia de activadores y en ausencia de inhibidores. Para que un sustrato se encuentre saturante, es necesario que su

concentración sea 10 veces la K_m . La afinidad K_m , es la concentración a la cual la enzima alcanza la mitad de la velocidad máxima (Rogers y Gibon, 2009). La eficiencia catalítica, fisiológica, V_m/K_m es la capacidad de la enzima de transformar el sustrato en producto (Saavedra, *et al.*, 2005).

Un primer acercamiento para determinar si una enzima puede ser controladora en una vía metabólica, es que su actividad sea menor a la del resto de las enzimas, siendo el paso limitante. El enfoque anterior no contempla la afinidad de la enzima por su sustrato, puede que el paso limitante se encuentre en alguna enzima cuya afinidad sea la menor de la vía. La eficiencia catalítica, contempla ambos parámetros cinéticos (Saavedra, *et al.*, 2005). Sin embargo, será posible señalar el grado de control de una enzima hasta tener un ACM completo (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007).

La velocidad máxima de una enzima se determina en condiciones de velocidad inicial. En la cual la concentración de sustrato se encuentra en exceso y la del producto es prácticamente nula (Rogers y Gibon, 2009). Para determinar la actividad de una enzima, primero se establece el rango de proteína con el cual se obtiene una actividad proporcional, es decir, si se ensaya con el doble o la mitad de proteína, corresponde con el doble o la mitad de la actividad. Después, si la enzima cuenta con activadores fisiológicos reportados, se realizan ensayos en los que se comparan diversos activadores. Los activadores se utilizan a diferentes concentraciones para establecer el mejor activador y la concentración óptima de activación. Por último se realizan ensayos donde el sustrato principal se varía (determinación experimental de K_m). En caso de contar con más de un sustrato, primero se determina la afinidad por uno de ellos. Después ese sustrato se mantiene en concentración fija saturante, y se varía la concentración de otro sustrato (Rogers y Gibon, 2009).

Para determinar los parámetros cinéticos de una enzima (V_m y K_m), se grafican los datos obtenidos experimentalmente: la velocidad de catálisis respecto a diferentes concentraciones de sustrato. Se realiza el ajuste no lineal en un programa computacional que indicará el comportamiento de la enzima, ya sea que se ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten o a la ecuación de Hill, con un sitio activo o más, respectivamente (Rogers y Gibon, 2009).

Ecuación de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

v velocidad
 V_m velocidad máxima
[S] concentración de producto
 K_m concentración a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima

Ecuación de Hill

$$r = \frac{n[S]^n}{K_d + [S]^n}$$

r fracción de sitios ocupados
 n moléculas de sustrato
[S] concentración de producto
 K_d constante de disociación, para [S]

Tabla 2. Comparación de velocidades máximas de algunas enzimas del ciclo de Krebs en mitocondrias aisladas de células tumorales y no tumorales.

<i>Enzima</i>	<i>Reportado</i> <i>(nmol/min*mg de proteína)</i>		<i>Incremento</i> <i>(veces)</i>
	<i>AS-30D</i>	<i>Hígado</i>	
Citrato sintasa	1007	143	7
Aconitasa	359	95	3.7
2-oxoglutarato deshidrogenasa	68	48	1.5
Isocitrato deshidrogenasa	297	35	8.5
Malato deshidrogenasa*	5515	3407	1.6

Tomado de Dietzen y Davis. Arch Biochem Biophys. 1993, 305:91-102.

*reacción en reversa, *reverse*

Tabla. 2. Se comparan las V_m determinadas en el hepatocarcinoma AS-30D con su tejido de origen hígado, así mismo se calcula su incremento en número de veces.

2. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas que controlan el ciclo de Krebs en células no tumorales son la IDH y la 2OGDH (Müller-Esterl, 2008). Estas enzimas incrementan su actividad (1.6 a 5.2 veces) y se presenta una mayor concentración de sus activadores fisiológicos. En conjunto esto puede indicar que las enzimas reguladoras son otras, al no ser estas los pasos limitantes en el flujo de la vía. Las enzimas que revelen menor eficiencia catalítica serán las enzimas que puedan controlar el flujo del CK en células tumorales.

3. HIPÓTESIS

En el ciclo de Krebs de células tumorales existe una redistribución del control en el flujo de la vía, en comparación con su tejido de origen, por lo que las enzimas limitantes son diferentes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Caracterizar cinéticamente a cada una de las enzimas del ciclo de Krebs en mitocondrias de células tumorales AS-30D.

4.2. Objetivos particulares

- Estandarizar las técnicas espectrofotométricas para medir la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs.
- Determinar los parámetros cinéticos (V_m y K_m) para cada una de las enzimas del ciclo de Krebs en mitocondrias aisladas de hepatoma AS30D.
- Determinar las velocidades máximas de cada enzima en mitocondrias de hígado de rata.
- Determinar y comparar las eficiencias catalíticas (V_{max}/K_m) de las enzimas del ciclo de Krebs de mitocondrias de AS-30D e hígado.
- Identificar a las enzimas menos eficientes en mitocondrias de AS-30D e hígado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Línea tumoral

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

5.2. Aislamiento de mitocondrias

La línea tumoral utilizada como modelo experimental, AS-30D, es un hepatocarcinoma ascítico de rata. Tiene como origen hígado de rata transformado por medio de la administración oral de 3'-metil-4-dimetilaminoazobenceno (0.06% w/w). (Smith, *et al.*, 1970). Esta línea pertenece a las células tumorales de rápido crecimiento, conforme a la clasificación de Pedersen (1978). Tiene como principales características: glucólisis aeróbica incrementada, acrecentada síntesis de lípidos y colesterol, así como elevada velocidad en el consumo de glutamato y glutamina (Greenhouse *et al.*, 1976; Pedersen 1978; Nakashima *et al.*, 1984; Briscoe *et al.*, 1994; Kelleher *et al.*, 1987). El líquido ascítico se caracteriza por baja glucosa y no presentar hipoxia (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2000).

5.2.1. AS-30D

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

7.4) (para lisar los eritrocitos presentes) y se centrifugó a 1800 rpm por 2 minutos a 4°C. Al término se descartó el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el botón celular en buffer NKT. El proceso de lavado se repitió hasta obtener el botón celular libre de eritrocitos, para ello se disminuyó entre cada lavado la velocidad de centrifugación (100 rpm), teniendo como límite de velocidad 800 rpm. Posteriormente, el botón se resuspendió en buffer SHE (Sacarosa 250mM, HEPES 10mM y EGTA 1mM, pH 7.4), se determinó la proteína celular (por el método de Biuret, conforme a Gornall *et al.* 1949, utilizando un estándar de albúmina sérica bovina de 100mg/mL) y se ajustó la suspensión celular a una concentración de 30 mg/mL. Con agitación continua y en presencia de albúmina sérica bovina al 0.4%, se agregó gota a gota digitonina (10 µg/mg de proteína celular). Se incubó la suspensión por tres minutos a 4°C. Pasado este tiempo, se adicionó SHE (20 mL) y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el botón y se homogenizó manualmente en un homogenizador de tejidos, émbolo-tubo de vidrio. El homogenizado se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante resultante se separó, el botón se resuspendió y se homogenizó nuevamente. Este proceso se repitió al menos 3 veces o hasta que el botón resultante fuera totalmente blanquecino. Los sobrenadantes se centrifugaron primero a 2500 rpm durante 5 minutos a 4 °C (para eliminar los restos celulares) y posteriormente al pasarlos a tubos limpios se centrifugaron a 9500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los botones se resuspendieron con 500 µL de SHE, se juntaron en un único tubo y se incubaron 10 minutos con ADP 1 mM y albúmina deslipidada al 0.1%. Al término de este tiempo se adicionó SHE (30 ml), y se centrifugó a 9800 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El botón se resuspendió con 1 mL de SHE y se determinó la concentración de proteína.

5.2.2. Hígado

A una rata hembra (cepa *Wistar*, 200-250 g) se le extrajo el hígado, se colocó en SHE y se cortó en trozos pequeños. Estos se homogenizaron manualmente en un homogenizador de tejidos, émbolo-tubo de vidrio. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se filtró con una gasa humedecida con SHE. Posteriormente el sobrenadante (ya filtrado) se centrifugó a 9500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se retiró y el botón mitocondrial se resuspendió con 1mL de SHE; se incubó 10 minutos con ADP 1 mM y albúmina deslipidada al 0.1%. Una vez transcurrido este tiempo las mitocondrias se resuspendieron en 30 mL de SHE y se centrifugó a 9800 rpm durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se retiró y el botón mitocondrial fue resuspendido con 1 mL de SHE y se determinó el contenido de proteína por el método de Biuret.

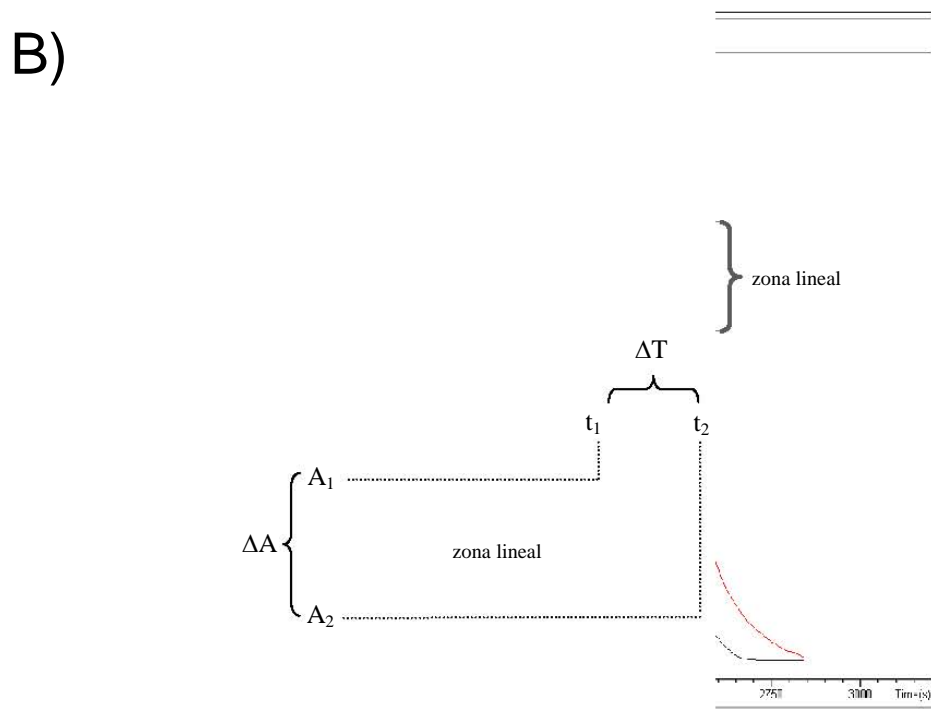
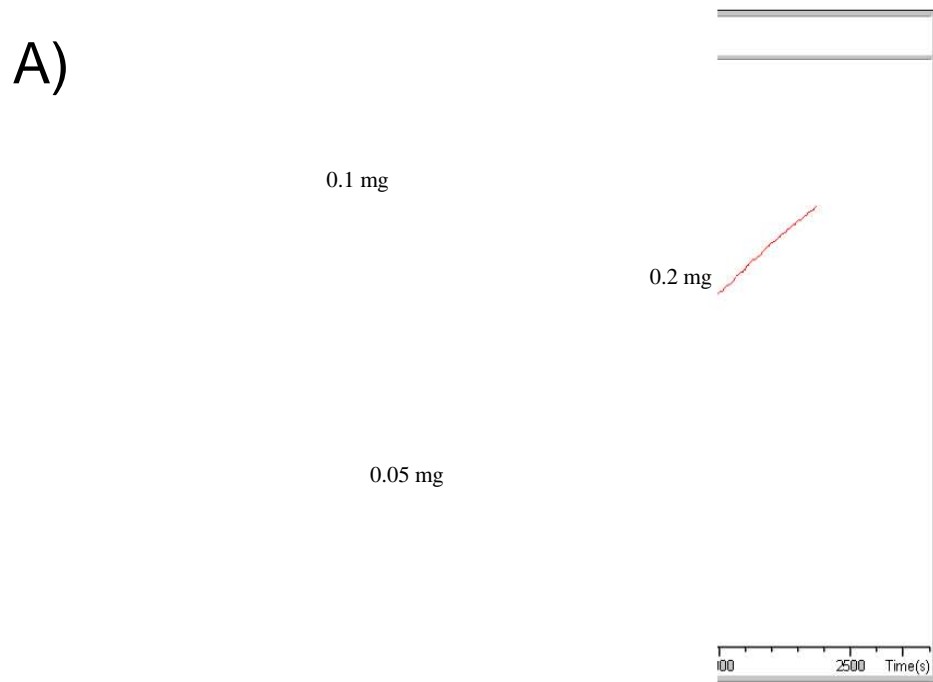


Fig.3. Trazos representativos: generación / consumo de NAD(P)H.

A) Cinética representativa de generación de NADH^+ y en donde se muestra como la variación de la actividad es proporcional a la cantidad de proteína ensayada.

B) Cinética representativa de consumo de NADH^+ . Se señala la zona en donde la pendiente es recta, y cuyos datos de absorbancia y de tiempo, se utilizaron para los cálculos de velocidad.

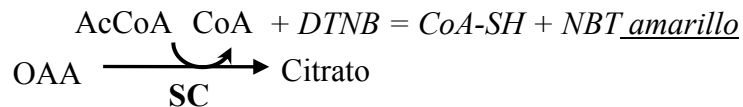
5.3. Determinación de actividades enzimáticas

Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Agilent 8453), en celdas de 1 cm de paso de luz y 1 mL de capacidad, en medio HKE (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) a 37°C. Las mitocondrias se permeabilizaron con tritón al 0.02%. La mayoría de los ensayos se acoplaron a reacciones que consumían o generaban NAD(P)H (Fig. 3) (con excepción de los ensayos de la CS, SDH y la fumarasa en la reacción *reverse*, ver detalles más adelante), que absorbe a una longitud de onda de 340 nm y tiene un coeficiente de extinción molar de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Rogers y Gibon, 2009). Para evitar el consumo del NADH por el complejo I (NADH deshidrogenasa) se agregó rotenona 4 μM . La sensibilidad de detección del método es de 0.6 nmol de NAD(P)H.

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

Citrato sintasa

Reacción:

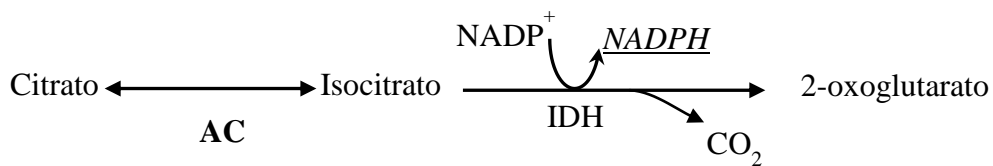


Para la determinación de la actividad de esta enzima (CS), se utilizó DTNB (5', 5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico), que al reaccionar con la CoA liberada durante la

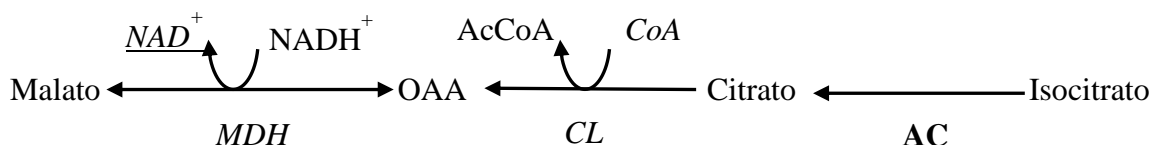
condensación, se forma CoA-SH y NTB, este último de color amarillo y que absorbe a 412 nm (coeficiente de extinción molar= $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La sensibilidad de detección para este método es de 0.14 nmol de TNB. Para determinar el valor de K_m por oxaloacetato, se mantuvo fija la concentración de acetil CoA, en 0.06 mM y se varió la concentración de oxaloacetato entre 0.005 y 0.2 mM. Mientras que para determinar la K_m por acetil CoA, la concentración se varió entre 0.003 a 0.3mM, manteniendo fija la concentración de oxaloacetato (0.1mM). En el ensayo se utilizó de 3 a 6 μg de proteína mitocondrial, DTNB 0.1 mM y la reacción se inició con la adición de acetil CoA.

Aconitasa

Reacción:



Como la enzima es sumamente sensible al oxígeno (estrés oxidativo), a las mitocondrias aisladas se les adicionó 1 mM de DTT. El medio de reacción (HKE) se burbujeó con nitrógeno por al menos 30 minutos, y el ensayo se realizó en una atmósfera saturante de nitrógeno. La reacción *forward* (citrato a isocitrato) se midió en presencia de isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ 3 μL (1:10)= 1 U, MnCl_2 0.5 mM y 0.25-0.5 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició con la adición de citrato (0.4 mM a 6 mM).



La reacción *reverse* (isocitrato-citrato) se acopló a citrato liasa (CL, 1U -que genera a partir de citrato, acetil-CoA y oxaloacetato-) y malato deshidrogenasa (MDH, 1U); en presencia de 0.25 a 0.5mg de proteína mitocondrial y MnCl_2 2 mM. La reacción se inició con la adición de DL-isocitrato 0.8 mM.

Isocitrato deshidrogenasa

NAD⁺-ICDH

En 1 mL de HKE (volumen final). Se añadió 0.1-0.2 mg de proteína mitocondrial, ADP 2 mM, NAD^+ 0.015-1.5 mM y MnCl_2 2 mM. La reacción se inició con la adición de DL-isocitrato (0.3-30mM). Cuando se determinaron los valores de K_m por NAD^+ e isocitrato, se mantuvo fija la concentración de isocitrato (2.5 mM) y la de NAD^+ (1 mM), respectivamente. Se comparó el efecto de los activadores MgCl_2 y MnCl_2 , en sus concentraciones óptimas.

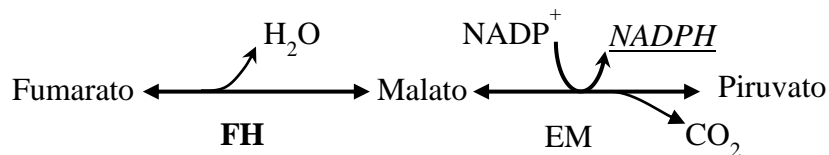
NADP⁺-ICDH

Para medir la actividad de esta isoforma se emplearon 0.1-0.2 mg de proteína mitocondrial, NADP^+ (0.01 a 1mM) y MnCl_2 (0.02 mM) o MgCl_2 (0.1mM). El ensayo se inició con la adición de DL-isocitrato (0.015 mM a 1.5 mM). Para determinar los valores de K_m por NADP^+ y DL-Isocitrato se mantuvo fija la concentración de DL-isocitrato (1 mM) o la de NADP^+ (1 mM), respectivamente.

El medio de reacción contenía PMS 0.4 mM, DCPIP 75 μ M y mitocondrias (0.25-1 mg de proteína). El ensayo se inició con la adición de succinato y se determinó la K_m al variar su concentración (0.1-10 mM). Se monitoreó la reducción del DCPIP ($\epsilon = 21.3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 600 nm.

Fumarasa

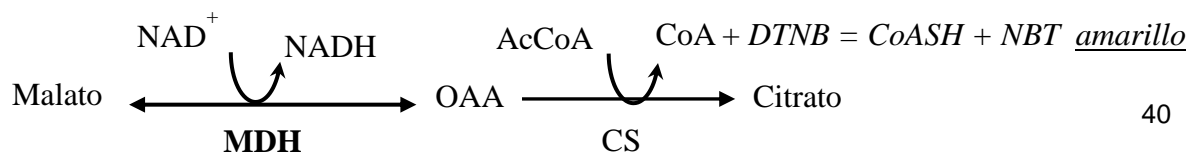
Reacción:



Para la determinación de los parámetros cinéticos de esta enzima en el sentido *forward* (fumarato \rightarrow malato), el ensayo se acopló a la enzima málica recombinante de *E. coli* dependiente de NADP^+ (1U) (que a partir de malato y NADP^+ genera piruvato, CO_2 y NADPH). Además de esta enzima, el medio de reacción contenía 30 a 60 μ g de mitocondrias, NADP^+ (0.5 mM) y MgCl_2 (2 mM). Con la adición de fumarato recién preparado (0.1 -10 mM) se comenzó la reacción.

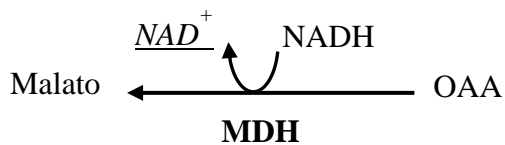
La reacción *reverse* (malato \rightarrow fumarato) se midió en celdas de cuarzo a 250 nm, a esta longitud de onda absorbe el fumarato que tiene un $\epsilon = 1.62 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La reacción se inició con la adición de malato (0.08-8 mM).

Malato deshidrogenasa



Dado que la reacción *reverse* se ve favorecida, para medir la reacción *forward* se acopló la reacción a citrato sintasa (CS, 1 U), para que el oxaloacetato generado en la reacción de la MDH se condensara con el acetyl CoA para formar citrato. Además el medio de reacción contenía 0.04 – 0.08 mg de mitocondrias, NAD^+ (0.004– 0.8 mM), AcCoA (0.8 mM) y malato (0.25– 5 mM). Para determinar los valores de K_m por NAD^+ o malato, las concentraciones de malato y NAD^+ que se usaron fueron 5 mM y 1 mM, respectivamente.

El ensayo para medir la reacción reversa contenía 6 – 12 μ g de mitocondrias, $NADH^+$ (0.001 a 0.1 mM) y oxaloacetato (0.008 a 0.8 mM), respectivamente. La reacción se inició con la adición del oxaloacetato. Para determinar la afinidad por $NADH^+$, la concentración de oxaloacetato utilizada fue 0.1mM, mientras que cuando se determinó la afinidad por oxaloacetato la concentración utilizada de $NADH^+$ fue 0.1mM.



5.4. Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos, se calculó la actividad correspondiente a la concentración de sustrato ensayada como se indica a continuación:

Cálculo de velocidad

En el trazo de la actividad, se verifica la zona lineal de la reacción, y se calculan los ΔA y ΔT .

Con los cambios de absorbancia y de tiempo se realiza el siguiente cálculo:

Datos: $\epsilon =$ Coeficiente de extinción molar (NAD^+) = $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\Delta t = 176.5$ segundos

$\Delta A = 0.05534$

Proteína utilizada en el ensayo = 0.034 mg^{14}

Actividad: $0.05534 / 6.22 = 8.89 \times 10^{-3} \text{ mM}$ de NADH en la celda de 1 mL, por lo cual

$8.89 \times 10^{-3} \text{ mM} \times 0.001 \text{ L} = 8.89 \times 10^{-6} \text{ mmol} = 8.89 \text{ nmol}$

$8.89 \text{ nmol} / 176.5 \text{ s} = 0.0504 \text{ nmol/s}$

$0.0504 \text{ nmol/s} \times 60 = 3.024 \text{ nmol/min}$

$(3.024 \text{ nmol/min}) / 0.034 \text{ mg} = 88.9 \text{ nmol / min} * \text{ mg}$

La concentración de los stocks de los sustratos se cuantificó por medio de ensayos enzimáticos asociados a la generación o consumo de NAD(P)H. De esta forma se determinó la concentración de cada stock. Los valores de velocidad y de las concentraciones de sustrato se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten; para determinar los parámetros cinéticos de velocidad máxima (V_m) y K_m . Este procedimiento se realizó en el programa computacional Origin5.0.

¹⁴ Proteína corregida por la concentración de la preparación y el volumen agregado en el ensayo.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización cinética

6.1.1 Aconitasa

La AC tiene en su sitio activo un centro hierro-azufre altamente sensible a oxígeno (estrés oxidativo), por este motivo la actividad de la aconitasa se midió en tres condiciones diferentes. En presencia de aire (atmosférico), con el medio de reacción burbujeado con nitrógeno (mínimo 30 minutos) y por último, con el medio de reacción burbujeado y una atmósfera de nitrógeno. En esta última condición la V_m que se obtuvo fue 6 veces mayor que en la condición con aire (fig. 4. A). La aconitasa es dependiente de Mn^{2+} , ya que es esencial para la actividad de la enzima, se probó variar la concentración de 0.25 a 1 mM y se determinó la concentración óptima de 0.5 mM. Al determinar la afinidad por citrato se observó una disminución en la actividad a una concentración mayor a 2 mM de citrato (fig. 4. B). Una explicación posible fue que el citrato estuviese quelando al manganeso (esencial para la reacción), pero el incremento en la concentración de Mn^{2+} durante el ensayo, no revirtió la inhibición, lo que sugirió que el Mn^{2+} quelado por citrato no fue lo que disminuyó la actividad enzimática, sino el incremento del citrato que ejerció inhibición por sustrato.

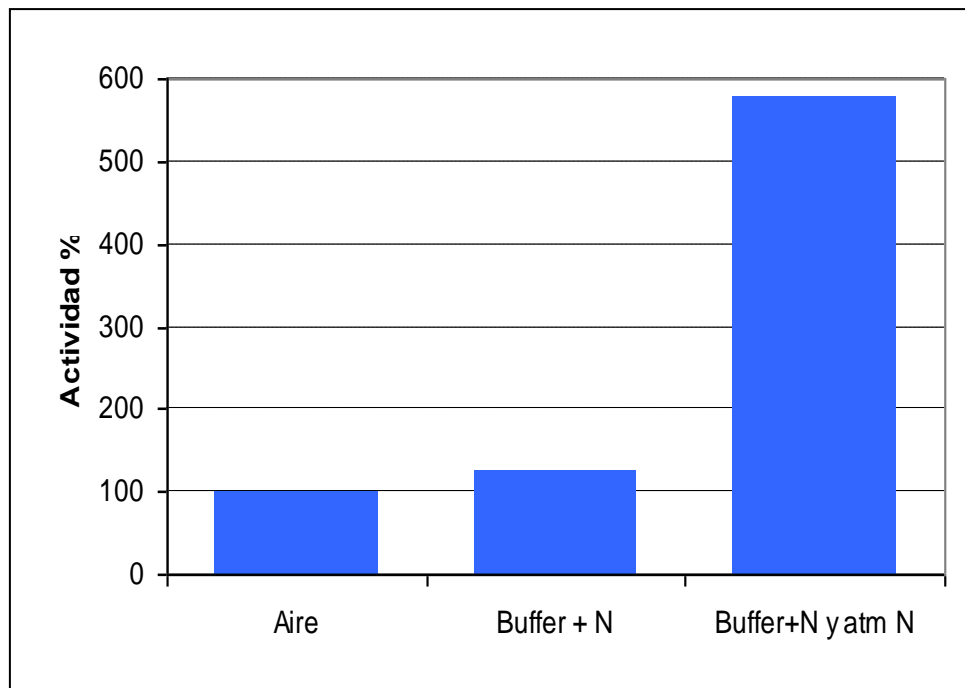
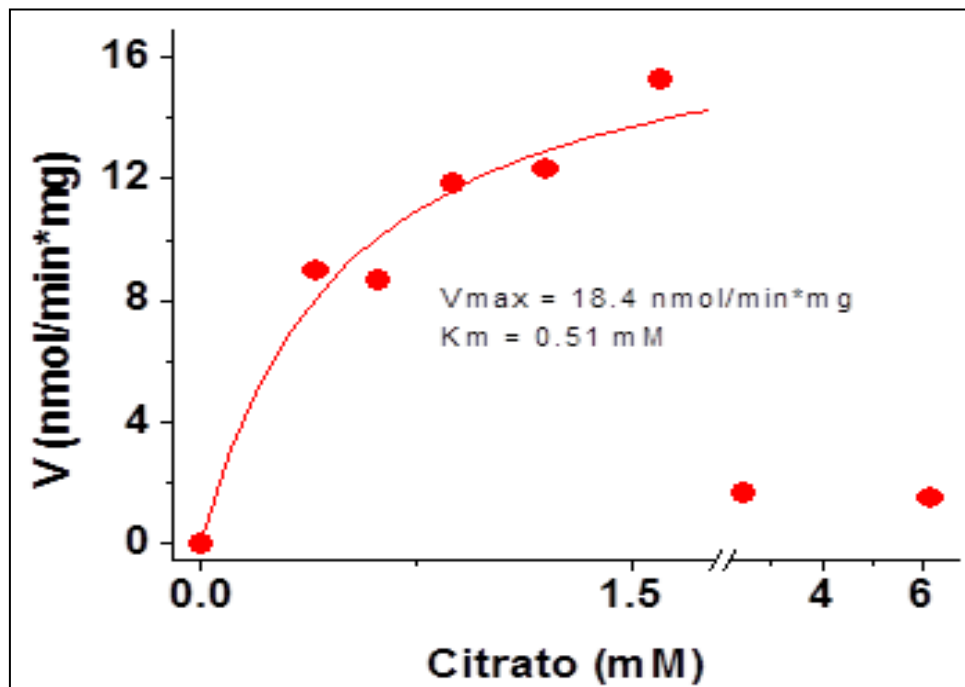
A**B**

Fig.4. Actividad de Aconitasa

A) Velocidad máxima de la aconitasa, en diversas condiciones: *Aire* (estándar), medio burbujeado con nitrógeno (medio + N) y medio burbujeado con nitrógeno y una atmósfera saturante de nitrógeno (medio +N y atm N).

B) Cinética de la aconitasa en buffer burbujeado con nitrógeno y atmósfera saturante de nitrógeno. Se observa inhibición por sustrato a concentraciones mayores de 1.6 mM, por lo que los últimos puntos no se utilizaron para el ajuste de la determinación de la V_m y la K_m .

6.1.2. Isocitrato deshidrogenasa

NAD⁺-ICDH

La enzima presentó cooperatividad con respecto al isocitrato (Fig. 5. A), teniendo como activadores alostéricos al Mn^{2+} , Mg^{2+} y a 1 ADP; sus concentraciones óptimas fueron 2, 10 y 1 mM, respectivamente. Debido al efecto sinérgico del ADP y Mn^{2+} sobre la actividad de la enzima, ambos se incluyeron en los ensayos de actividad.

NADP⁺-ICDH

En el caso de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de $NADP^{+}$, no se observó cooperatividad con respecto a isocitrato, la enzima presentó una cinética hiperbólica (Fig. 5. B). El mejor activador fue el magnesio seguido por manganeso, sus concentraciones óptimas fueron de 0.1 y 0.02 mM, respectivamente.

6.1.3. Succinato deshidrogenasa

La actividad de la enzima fue 10 veces menor a la que se estimó a partir del consumo de oxígeno en condiciones saturantes de succinato. En mitocondrias de AS-30D e hígado, la velocidad de consumo de oxígeno fue de 240 y 90 ngAtO min mg, mientras que por el método espectrofotométrico con DCPIP fue de 15 y 40 nmol/min*mg, respectivamente. Lo que sugiere que con el método espectrofotométrico se subestima la actividad de la enzima, y se tendrá que buscar otra técnica para caracterizar a la enzima..

NOTA: El resto de las caracterizaciones no se describen, porque a) las enzimas presentaron comportamiento michaeliano, y b) se resolvió la estandarización de la técnica.

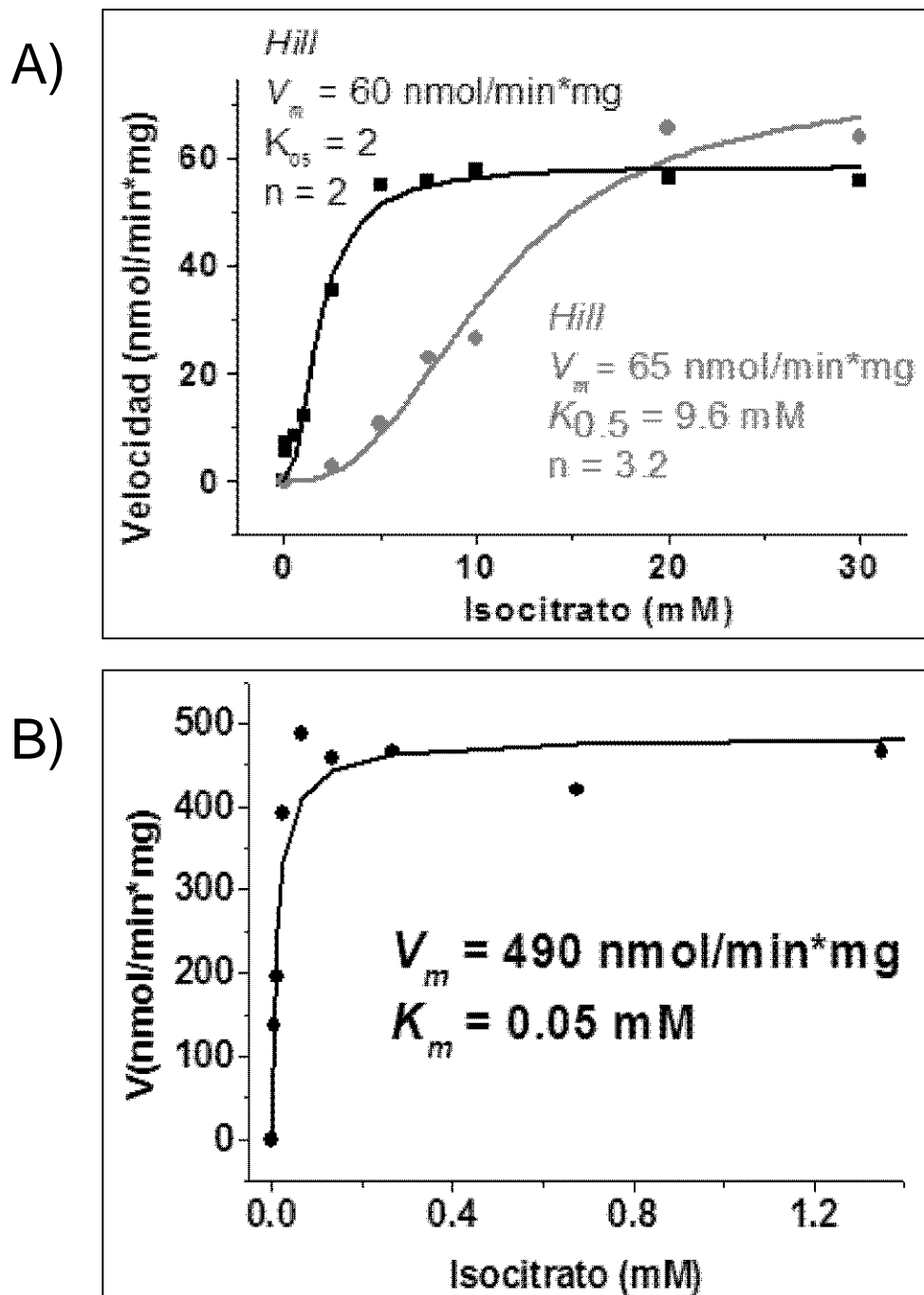


Figura 5. Isocitrato deshidrogenasa.

A) Cinética de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , los datos se ajustaron a la ecuación de Hill (ecuación logarítmica aplicada a enzimas de comportamiento cooperativo, es decir, con más de un sitio activo, Sección III), en ambos ajustes se observa cooperatividad de la enzima por isocitrato, en presencia de Mg^{2+} (símbolos rojos) o Mn^{2+} (símbolos negros).

B) Cinética de isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ con Mn^{2+} 0.1 mM, los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación que describe cómo varía la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato, descrita en la Sección III).

6.2. Parámetros cinéticos de cada una de las enzimas del ciclo de Krebs

6.2.1. Afinidades

En general, las afinidades (K_m) determinadas para las enzimas del ciclo de Krebs en mitocondrias aisladas de AS-30D fueron similares a los reportados para enzimas no tumorales (Tabla 3). Las enzimas NAD^+ -IDH, 2OGDH y FH presentaron diferencias en la afinidad. Para descartar que la diferencia se debiera a las condiciones experimentales o la metodología utilizada, se realizó la caracterización cinética de estas enzimas en hígado (NAD^+ / NADP^+ -ICDH, 2OGDH y FH). En particular la NAD^+ -ICDH mostró una menor afinidad por isocitrato con respecto a la enzima de hígado, también la FH mostró menor afinidad por fumarato, mientras que la afinidad incrementó por malato, a diferencia de la enzima de hígado, en donde ocurrió lo contrario. Lo anterior sugirió la presencia de enzimas diferentes en cada tipo de mitocondrias, es decir la presencia de isoformas.

6. 2.2. Velocidades máximas

Las enzimas de AS-30D tuvieron una velocidad máxima mayor en comparación con las mitocondrias de hígado, como fue reportado por Dietzen y Davis (1993) (tabla 4).

En particular, la velocidad máxima de la fumarasa se incrementó 20 veces, en otras enzimas como la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ y NAD^+ , citrato sintasa, malato deshidrogenasa (en la reacción *reverse*) y la fumarasa (en la reacción *reverse*), se incrementó la V_m de 1.8 a 5 veces, dicho aumento fue estadísticamente significativo (p 0.05-0.001). Las enzimas con menor V_m , fueron la AC, la 2OGDH y la SDH.

Algunas enzimas presentaron inhibición por sustrato (AC, 2OGDH y MDH), sin embargo, las condiciones para que esto ocurra, son concentraciones de los sustratos que no se alcanzan fisiológicamente.

6.2.3. Eficiencias catalíticas

En AS30D las eficiencias catalíticas se calcularon a partir de los valores de V_m y K_m , en el caso de AS-30D, se utilizaron las velocidades máximas y afinidades determinadas, mientras que en el caso de hígado, se utilizaron las velocidades máximas determinadas en estas mitocondrias y las afinidades determinadas en AS-30D. Ya que en se encontró que los valores de K_m fueron similares a los reportados para las enzimas no tumorales. Analizando las eficiencias de cada reacción por separado (*forward* y *reverse*), en AS-30D las enzimas menos eficientes fueron la SDH, O2GDH y NAD^+ -IDH. En hígado, las enzimas menos eficientes con este análisis fueron la 2OGDH, AC y FH (tabla 5). Sin embargo, al tomar en cuenta la eficiencia de la reacción en ambos sentidos (reacción global), las menos eficientes en hígado y AS-30D fueron la MDH, 2OGDH y NAD^+ -IDH; adicionalmente en hígado la FH (tabla 5).

Tabla 3. Afinidades determinadas para las enzimas del ciclo de Krebs en mitocondrias de células tumorales y las afinidades reportadas para enzimas de células normales.

<i>Enzima</i>	<i>Sustrato</i>	<i>AS-30D No tumoral</i>	
		<i>K_m</i>	
<i>CS</i>	OAA	11	6
	AcCoA	3	5 ^a
<i>AC</i>	Cit (Mn ²⁺ 2mM)	500	950 ^a
<i>NAD⁺-ICDH</i>	Isocit (Mn ²⁺ 2mM)	900	2 200 ^b (130)
	NAD ⁺	300	80
<i>NADP⁺-ICDH</i>	Isocit (Mg ²⁺ 1mM)	46	22 ^a (40)
	NADP ⁺	78	56 ^a
<i>20GDH</i>	20G	730	117 ^b (400)
	CoA	50	ND
	NAD ⁺	630	ND

<i>Enzima</i>	<i>Sustrato</i>	<i>AS-30D No tumoral</i>	
		<i>K_m</i>	
<i>SDH</i>	Succ	92	25 ^a
<i>FH</i>	Fum (Mg ²⁺ 1.5mM)	1 000	5 ^c (530)
	Mal	400	25 ^c (1 700)
<i>MDH</i>	Mal	450	NR
	NAD ⁺	110	NR
	OAA	7	40 ^a
	NADH ⁺	17	50 ^a

Los valores de *K_m* (μM) son de diversas fuentes tales como ^arata, ^bhumano, y ^ccerdo. NR No reportado ND No determinado. n=1

Entre paréntesis se presentan los valores de afinidad determinados en mitocondrias aisladas de hígado de rata.

CS citrato sintasa, AC aconitasa, NAD⁺-ICDH isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD, NADP⁺-ICDH isociteato deshidrogenasa dependiente de NADP, 20GDH 2-oxoglutarato deshidrogenasa, SDH succinato deshidrogenasa, FH fumarasa, MDH malato deshidrogenasa

Tabla 4. Velocidades máximas determinadas para las enzimas del ciclo de Krebs en mitocondrias aisladas de hígado y AS-30D.

<i>Enzima</i>		<i>Hígado</i>	<i>AS-30D</i>	<i>Incremento AS-30D / Hígado</i>
CS	V_{mf}	495 ± 140	1260 ± 470 *	2.5
AC	V_{mf}	13 ± 8	20 ± 10	1.5
	V_{mr}	ND	8 (1)	-
NAD⁺-ICDH	V_{mf}	35 ± 15	130 ± 80 *	3.7
NADP⁺-ICDH	V_{mf}	100 ± 40	520 ± 300 *	5.2
2OGDH	V_{mf}	12 ± 6	20 ± 10	1.6
SDH	V_{mf}	40 ± 10	13 ± 8	-
FH	V_{mf}	170 ± 10	3360 ± 340 **	20
	V_{mr}	190 ± 80	340 ± 90 *	1.8
MDH	V_{mf}	520 ± 270	300 ± 115	-
	V_{mr}	1 100 ± 520	2 070 ± 460 *	1.9

± D.E. ND, No determinado. n=3-8 $p \leq 0.05^*$, $< 0.001^*$ vs hepatocitos. Las velocidades máximas se determinaron en condiciones saturantes de sustrato (al menos 10 veces el valor de K_m) y concentraciones óptimas de activadores a 37°C y pH 7.4 (ver la sección de métodos). CS citrato sintasa, AC aconitasa, NAD⁺-ICDH isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD, NADP⁺-ICDH isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP, 2OGDH 2-oxoglutarato deshidrogenasa, SDH succinato deshidrogenasa, FH fumarasa, MDH malato deshidrogenasa, V_{mf} velocidad máxima forward, V_{mr} velocidad máxima reverse.

Tabla 5. Eficiencias catalíticas de las enzimas del ciclo de Krebs determinadas en mitocondrias de hígado y AS-30D.

<i>Enzima</i>	<i>Sustrato</i>	<i>AS-30D</i>		<i>Hígado</i>	
		$(V_m/K_m)_{fo}$ $(V_m/K_m)_r$	$(V_m/K_m)_{f-}$ $(V_m/K_m)_r$	$(V_m/K_m)_{fo}$ $(V_m/K_m)_r$	$(V_m/K_m)_{f-}$ $(V_m/K_m)_r$
<i>CS citrato sintasa</i>	oxaloacetato	0.12	0.12	0.05	0.05
<i>AC aconitasa</i>	citrato	2×10^{-4}	ND	2×10^{-5}	ND
<i>NAD⁺-ICDH isocitrato deshidrogenasa</i>	isocitrato	1.3×10^{-4}	1.3×10^{-4}	2.2×10^{-4}	2.2×10^{-4}
<i>NADP⁺-ICDH isocitrato deshidrogenasa</i>	isocitrato	0.01	0.01	4×10^{-3}	4×10^{-3}
<i>2OGDH 2-oxoglutarato deshidrogenasa</i>	2-oxoglutarato	1.3×10^{-5}	1.3×10^{-5}	4×10^{-5}	4×10^{-5}
<i>SDH succinato deshidrogenasa</i>	succinato	4×10^{-5}	ND	2×10^{-3}	ND
<i>FH fumarasa</i>	fumarato	3.4×10^{-3}	2.5×10^{-3}	6.6×10^{-4}	-4.6×10^{-4}
	malato	9×10^{-4}		2×10^{-4}	
<i>MDH malato deshidrogenasa</i>	malato	2.2×10^{-4}	-0.3	1×10^{-3}	-0.16
	oxaloacetato	0.3		0.16	

Eficiencia Catalítica = V_m/K_m , en (L / min* mg)

ND = No Determinado

Se presentan los cálculos de las eficiencias catalíticas (V_m/K_m), tanto en *forward*, como en *reverse* por separado; para la reacción global se tomó en cuenta la eficiencia en ambos sentidos, *forward* y *reverse*. .

7. DISCUSIÓN

.El ciclo de Krebs es una vía de vital importancia para la célula, una de sus funciones principales es la de producir el poder reductor que es utilizado por la cadena respiratoria para generar el gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP. En el caso de las células proliferativas, como las tumorales, esta vía participa de manera significativa con la síntesis de precursores para formación de macromoléculas. Estudios previos indican que esta vía contribuye en el control de la fosforilación oxidativa. Por ello, su estudio puede ser útil para proponer nuevos blancos terapéuticos.

En esta tesis se realizó la caracterización cinética de la mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs. La velocidad de las enzimas en AS-30D fue de 1.4 a 20 veces mayor comparada con las enzimas de hígado de rata. No obstante a ello, las enzimas AC, 2OGDH, NAD^+ -ICDH y la SDH presentaron velocidades menores en la vía completa. Esto puede deberse a una subestimación, al menos con la AC y SDH, La AC es una enzima altamente sensible a estrés oxidativo (por lo que es un biomarcador de dicho estrés) reduciendo su actividad, al no encontrarse en la mitocondria intacta, donde también se encuentran las defensas antioxidantes La baja velocidad de la SDH puede atribuirse a la inespecificidad en la reducción del DCPIP. Esto último fue validado con la velocidad de consumo de oxígeno inducido por succinato que fue mayor respecto a la determinada con la reducción del DCPIP

Sin embargo, un análisis de velocidad máxima no es suficiente para señalar a una enzima como limitante (o la que podría ejercer control sobre el flujo de una vía), ya que también depende de la afinidad que tiene por su sustrato.

Las afinidades de la mayoría de las enzimas no mostraron, diferencias entre las reportadas en células o tejidos no tumorales y tumorales, sugiriendo que no hay expresión de isoformas. Sin embargo: AC, NAD⁺-ICDH, SDH y FH; presentaron diferencias en su afinidad por citrato, isocitrato, succinato y fumarato, respectivamente. Estos cambios en la afinidad podrían indicar la expresión diferencial de isoformas entre células tumorales y no tumorales con diferentes afinidades, como ocurre para la glucólisis (Marín-Hernández *et al.*, 2009), o bien, podría atribuirse a alguna mutación en los genes que las codifican (Lu *et al.*, 2012; Turcan *et al.*, 2012).

Con los valores de V_m y K_m , se puede tener una primera aproximación para determinar si una enzima ejerce control en una vía metabólica, al calcular la eficiencia catalítica (V_m/K_m) (Saavedra-Lira *et al.*, 2005). La velocidad máxima y la afinidad por separado, indican que tan rápido la enzima transforma el sustrato en producto y la afinidad con la que se une a este, respectivamente. Al involucrar ambos parámetros, se determina la capacidad de la enzima de transformar el sustrato en producto. Si la enzima es poco eficiente, por convertir lentamente el sustrato en producto y/o requerir de altas concentraciones de sustrato para llevar a cabo su función; muy probablemente esta será una enzima limitante en el flujo de la vía, y podría controlarlo. (Fell D., 1997).

El análisis de las eficiencias catalíticas indica que las enzimas menos eficientes en hígado y AS-30D son las mismas: la MDH, la 2OGDH y la NAD⁺-ICDH. A pesar del incremento de las velocidades máximas y cambios puntuales en las afinidades. Esto se debe a que la 2OGDH y la NAD⁺ ICDH son las enzimas que mantienen menor velocidad máxima en el ciclo y una baja afinidad por sus sustratos. Debido a estas características son los principales sitios de control (Müller-Esterl, 2008). Por otro lado, el que la MDH sea una de las enzimas menos eficientes es de llamar la atención. El análisis cinético nos

permite entender por qué. Esto se debe a que la reacción *reverse* (oxaloacetato→ malato) se ve favorecida por la alta afinidad que tiene la MDH por oxaloacetato (7 μM) a diferencia de la que tiene por malato (450 μM). La enzima transforma el malato a oxaloacetato siempre y cuando este metabolito sea consumido inmediatamente por la CS en condiciones fisiológicas. De lo contrario el oxaloacetato se transforma inmediatamente en malato.

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

8. CONCLUSIÓN

Las enzimas, 2OGDH, NAD^+ -ICDH y MDH son menos eficientes catalíticamente y posibles sitios de control en mitocondrias tumorales, también son las menos eficientes en su tejido de origen

9. PERSPECTIVAS

Determinar la concentración de metabolitos y el flujo del ciclo de Krebs en mitocondrias aisladas. Construir el modelo cinético del ciclo de Krebs.

10. REFERENCIAS

- Aguirre JD, Culotta VC. (2012). Battles with iron: manganese in oxidative stress protection. *J Biol Chem.* 20;287(17):13541-8. Review.
- Arismendi-Morillo G. (2009). Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Oct;41(10):2062-8. Review.
- Baggetto LG. (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie.* Nov;74(11):959-74. Review.
- Brière JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P. (2006). Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291(6):C1114-20. Epub 2006 Jun 7. Review.
- Briscoe DA, Fiskum G, Holleran AL, Kelleher JK. (1994). Acetoacetate metabolism in AS-30D hepatoma cells. *Mol Cell Biochem.* 1994 Jul 27;136(2):131-7.
- Carew J. S., & Huang P., (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer.* Dec 9;1:9. Review.
- Chen L, Zheng S. Identify alternative splicing events based on position-specific evolutionary conservation. *PLoS One.* 2008 Jul 30;3(7)
- D. Voet, J, Voet (1995). *Biochemistry.* 2nd edition. John Wiley and Sons.
- Dietzen D. J., Davis E. J. (1993). Oxidation of pyruvate, malate, citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria. *Arch BiochemBiophys.* Aug 15;305(1):91-102.

- Dong LF, Jameson VJ, Tilly D, Cerny J, Mahdavian E, Marín-Hernández A, Hernández-Esquivel L, Rodríguez-Enríquez S, Stursa J, Witting PK, Stantic B, Rohlena J, Truksa J, Kluckova K, Dyason JC, Ledvina M, Salvatore BA, Moreno-Sánchez R, Coster MJ, Ralph SJ, Smith RA, Neuzil J. (2011). Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J Biol Chem.* Feb 4;286(5):3717-28
- Gauthier T, Denis-Pouxviel C & Murat JC (1990) Respiration of mitochondria isolated from differentiated and undifferentiated HT29 colon cancer cells in the presence of various substrates and ADP generating systems. *Int J Biochem* 22, 411–417.
- Globocan 2008, IARC, 2010. International Agency for Research on Cancer. WHO. Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008.
- Greenhouse WV, Lehninger AL. (1977). Magnitude of malate-aspartate reduced nicotinamide adenine dinucleotide shuttle activity in intact respiring tumor cells. *Cancer Res.* 1977 Nov;37(11):4173-81.
- Gunter TE, Gavin CE, Gunter KK. (2009). The case for manganese interaction with mitochondria. *Neurotoxicology.* 30(4):727-9. doi: 10.1016/j.neuro.2009.05.003.
- Gunter TE, Gerstner B, Lester T, Wojtovich AP, Malecki J, Swarts SG, Brookes PS, Gavin CE, Gunter KK. (2010). An analysis of the effects of Mn²⁺ on oxidative phosphorylation in liver, brain, and heart mitochondria using state 3 oxidation rate assays. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Nov 15;249(1):65-75.

- Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. Mar 4;144(5):646-74. Review.
- Hawkins, C. F., *et al.* (1989). Perham. A common structural motif in thiamin pyrophosphate binding enzymes. *Febs Lett*; 255(1): 77-82.
- Horberg J. J. *et al.* (2007). Metabolic Control Analysis to identify optimal drug targets. *Progress in Drug Research*, Vol. 64.
- Houston, M. A., Augenlicht, L. H., HeerdtM, B.G. (2011). Stable Differences in Intrinsic Mitochondrial Membrane Potential of Tumor Cell Subpopulations Reflect Phenotypic Heterogeneity. *International Journal of Cell Biology*. Volume 2011 (2011), Article ID 978583, 11 pages
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2008. Estadísticas a propósito del Día Mundial Contra el Cáncer. Datos Nacionales. Estadísticas Vitales, defunciones 2007.
- Kalia K, Zheng W, Jiang W. (2009). Importance of mitochondria in manganese-induced cellular toxicity. *Neurotoxicology*. 30(4):727.
- Kallinowski F, Schlenger KH, Kloes M, Stohrer M & Vaupel P (1989) Tumor blood flow: the principal modulator of oxidative and glycolytic metabolism, and of the metabolic micromilieu of human tumor xenografts in vivo. *Int J Cancer* 44, 266–272.
- Kelleher JK, Bryan BM 3rd, Mallet RT, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G. (1987). Analysis of tricarboxylic acid-cycle metabolism of hepatoma cells by comparison of $^{14}\text{CO}_2$ ratios. *Biochem J*. 1987 Sep 15;246(3):633-9.

- Lanks KW & Li PW (1988) End products of glucose and glutamine metabolism by cultured cell lines. *J Cell Physiol* 135, 151–155.
- López-Gómez FJ, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. (1993). Control of oxidative phosphorylation in AS-30D hepatoma mitochondria. *Int J Biochem.* Mar;25(3):373-7.
- Lu, P. S. Ward, G. S. Kapoor *et al.*, (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, vol. 483, pp. 474–478.
- Marín Hernández , *et al.* (2012). Casiopeína II gly and BromoPyruvate inhibition of tumor hexokinase. *Archives of Toxicology*. May 2012, Volume 86, Issue 5, pp 753-766.
- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. (2009). HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem.* Aug;9(9):1084-101. Review.
- Marín-Hernández A. *et al.* (2011). Modeling Cancer glycolysis. *Biochem Biophys Acta.* 1807:755-67.
- Marín-Hernández, A. (2009). El Factor Inducido por la Hipoxia (HIF-1) y la Glucólisis en las células tumorales. *Revista de Educación Bioquímica*, 28 (2): 42-51.
- Marín-Hernández, A., *et al.* (2006). Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. *FEBS Journal*, 273:1975-88.

- Maurice Israël, Laurent Schwartz. (2011). The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer*. 10: 70.
- Miralpeix M, Azcon-Breto J, Bartrons R & Argilés JM (1990) The impairment of respiration by glycolysis in the Lewis lung carcinoma. *Cancer Lett* 50, 173–178.
- Moreadith, R.W., Fiskum, G. (1984). Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin. *Analytical Biochemistry* 137, 360-7.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 274(6):1393-418. Review.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC. (2009). The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors*. 35(2):209-25. Review.
- Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Quezada H, Westerhoff HV. (2010). Metabolic control analysis indicates a change of strategy in the treatment of cancer. *Mitochondrion*. 10(6):626-39.
- Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S, Olín-Sandoval V. (2008). Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol*. Review.
- Moreno-Sánchez, *et al.* (2010). Molecular Mechanisms and New Therapeutic Targets in Human Carcinogenesis. *Molecular Aspects of Medicine*. Volume 31, Issue 2, April 2010, Pages 145–170
- Moreno-Sánchez, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007 Mar;274(6):1393-418. Review.

- Müller-Esterl (2008). Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. Versión Española por Dr. Centelles Serra. Reverté, Barcelona.
- Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL. (1984). Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res.* 1984 Dec;44(12 Pt 1):5702-6.
- Nelson, D. L., Cox M.M., (2008). Lehninger principles of biochemistry. 5th Edit.
- Norris J. J. R., Ribbons D. W. (ed.) Chapter X. Methods in microbiology, volume 6a. Academic Press, Dec 31.
- Onozuka H, Tsuchihara K, Esumi H. (2011). Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci.*102(5):975-82.
- Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem.* Aug 23;277(34):30409-12.
- Pedersen PL. (1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res.* 1978;22:190-274. Review.
- Pelicano H., *et al.* (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25, 4633-4646.
- Piva & McEvoy-Bowe. (1998). Oxidation of glutamine in HeLa cells: role and control of truncated TCA cycles in tumour mitochondria. *J Cell Biochem.* Feb 1;68(2):213-25.
- Pollard PJ, Wortham NC, Tomlinson IP. The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. *Ann Med.* 003;35(8):632-9.

- Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, Moreno-Sánchez R. (2009). Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Mol Aspects Med.* 2010 Feb;31(1):29-59. Review.
- Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. (2010). The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med.* 31(2):145-70.
- Reisch AS, Elpeleg O. Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc. *Methods Cell Biol.* 2007;80:199-222. Review.
- Robey RB, Hay N. (2009). Is Akt the "Warburg kinase"? A energy metabolism interactions and oncogenesis. *SeminCancer Biol* 2009; 19:25-31.
- Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandoval V, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. (2010). Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol.* (10):1744-51. doi: 10.1016/j.biocel.2010.07.010. Epub 2010 Jul 21.
- Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Aguilar-Ponce JL, Mandujano-Tinoco EA, Meneses A, Moreno-Sánchez R. (2011). Oxidative phosphorylation as a target to arrest malignant neoplasias. *Curr Med Chem*;18(21):3156-67.
- Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Dong LF, Akporiaye ET, Neuzil J, Ralph SJ, Moreno-Sánchez R. (2012). Molecular

mechanism for the selective impairment of cancer mitochondrial function by a mitochondrially targeted vitamin E analogue. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1817(9):1597-607. doi: 10.1016/j.bbabi.05.005. Epub 2012 May 22. PubMed

- Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L, Moreno-Sánchez R. (2009). Targeting of cancer energy metabolism. *Mol Nutr Food Res*. 53(1):29-48. doi: 10.1002/mnfr.200700470.
- Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007 Mar;274(6):1393-418. Review.
- Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. (1998). Intermediary metabolism of fast-growth tumor cells. *Arch Med Res*. Spring;29(1):1-12. Review.
- Rodríguez-Enríquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodríguez FL, Marín-Hernández A, Ruiz-Azuara L & Moreno-Sánchez R (2006) Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 215, 208–217.
- Rodríguez-Enríquez, *et al.* (2000). Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys*. 2000; 375 No.1(Mrch 1): 21-30.
- Rogers A., Gibon Y. (2009). Chapter 4 Enzyme Kinetics: Theory and Practice. 71-103. J. Schwender (ed.),. *Plant Metabolic Networks*.
- Romero-García, *et al.* (2011). Tumor cell metabolism An integral view. *Cancer Biology & Therapy* 12:11, 939–948; December 1, 2011; G 2011 Landes Bioscience
- S. Turcan, D. Rohle, A. Goenka, *et al.*, (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, vol. 483, pp. 479–483, 2012.

- Saavedra-Lira, *et al.* (2005). Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. FEBS J. Apr;272(7):1767-83.
- Saavedra-Lira, *et al.* (2005). Glycolysis in *Entamoeba Histolytica*. Biochemical characterization of recombinant glycolytic enzymes and flux control analysis. FEBS J. 272:1767-83.
- Sauer LA (1977) On the mechanism of the Crabtree effect in mouse ascites tumor cells. J Cell Physiol 93, 313–316.
- Smith DF, Walborg EF Jr, Chang JP. (1970). Establishment of a transplantable ascites variant of a rat hepatoma induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res. 1970 Sep;30(9):2306-9.
- Sonveaux, *et al.*, (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. J. Clin. Invest. 118, 3930-42.
- Tysnes, B. y Bjerkvig R. (2007). Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. Biochem. Biophys. Acta. 1775:283-297.
- Vogelstein, B. y Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. Nature Med. 10, 789-799.
- Walden, W. E., (2006). Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. Science. 2006 Dec 22;314(5807):1903-8.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. Science. New Series 123 :3191, 309-14.
- Wenner CE. Targeting mitochondria as a therapeutic target in cancer. J Cell hysiol. 2012 Feb;227(2):450-6. doi: 10.1002/jcp.22788. Review.

- Yogev O, Naamati A, Pines O. (2011). Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions. FEBS J. Nov;278(22):4230-42. Epub 2011 Oct 24. Review.
- Zu X.L., Guppy M. (2003). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. Biochemical and Biophysical Research Communications. Volume 313, Issue 3, 16 January 2004, Pages 459–465.