



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS  
ENZIMAS DEL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO  
EN CÉLULAS TUMORALES AS-30D”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARCO ANTONIO REYES GARCÍA



Ciudad de México

Noviembre 2016



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: Profesor: Martha Patricia Neri Páez

VOCAL: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SECRETARIO: Profesor: Álvaro Marín Hernández

1er. SUPLENTE: Profesor: Aurora Lara Núñez

2° SUPLENTE: Profesor: Laura Carmona Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

ASESOR DEL TEMA:

SUSTENTANTE :

\_\_\_\_\_

Dr. Álvaro Marín Hernández

\_\_\_\_\_

Marco Antonio Reyes García



## Dedicatoria

A mis padres Tere García y Marco Antonio Reyes, mi hermana Denise Reyes y a mis ahijados Dilan y Brayan Perales.

Su amor, complicidad y apoyo me hacen vivir siempre lo mejor de la vida.

Marco Antonio

## Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. Álvaro Marín Hernández, por su infinita paciencia, confianza, enseñanza y apoyo.

Al Dr. Rafael Moreno y la Dra. Sara Rodríguez, por su formación y ejemplo.

A mis amigos, en especial a Ileana Hernández por ser una extraordinaria mujer, amiga e investigadora.

A los compañeros del laboratorio, Sayra, Isis, Silvia y Juan por ser un gran apoyo y hacer más ameno cada día.

A cada miembro del departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, por sus críticas y aportaciones a este trabajo.

A Marcela Sosa y la Dra. Marina Macías del Instituto de Fisiología Celular por el apoyo a este proyecto.

A Ricardo Álvarez, Federico Guevara, Ma. Del Socorro Becerra, Eduardo Dondé, Nancy Monroy, Catalina Gayosso, David Morales y José Luis Rodríguez por ser fuentes de luz e inspiración en mi caminar.

A cada persona que forma parte de mi día a día, familia y amigos, en especial a mi familia de Turiran, pues encuentro una enseñanza y crecimiento en cada una.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo y patrocinio a este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente a la H. Facultad de Química, por la formación académica y personal recibida.

“CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS ENZIMAS  
DEL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO  
EN CÉLULAS TUMORALES AS-30D”



## Abreviaturas

ADP	Difosfato de adenina
AMP	Monofosfato de adenina
ATP	Trifosfato de Adenosina
BRCA	Supresor de tumores, cáncer de seno
c-MYC	Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERB	Protooncogen cúmulo de diferenciación celular
G1,6BP	Glucosa 1,6 bisfosfato
G1P	Glucosa 1-fosfato
G6P	Glucosa 6-fosfato
GBE	Enzima ramificante
Glc	Glucosa
GLUT	Transportador de glucosa
GS	Glucógeno sintasa
HGF	Factor de crecimiento hepático
HK	Hexocinasa
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
Km	Afinidad enzimática
NADP(H)	Niconinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (protonado)
OMS	Organización Mundial de la Salud
p53	Gen supresor de tumores
PGM	Fosfoglucomutasa
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato
TGF-	Factor de crecimiento transformante beta
UDPG	UDP-glucosa
UGP	UDP-glucosa pyrofosforilasa
UTP	Trifosfato de uridina

Vm	Velocidad máxima
HGF	Factor de crecimiento hepático
c-MYC	Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis
ERB	Protooncogen cúmulo de diferenciación celular
p53	Gen supresor de tumores
TGF-	Factor de crecimiento transformante beta
BRCA	Supresor de tumores, cáncer de seno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
OMS	Organización Mundial de la Salud
NADP(H)	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (protonado)
ATP	Trifosfato de Adenosina
GLUT	Transportador de glucosa
HK	Hexocinasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
G1P	Glucosa 1-fosfato
UGP	UDP-glucosa pyrofosforilasa
UTP	Trifosfato de uridina
UDPG	UDP-glucosa
GS	Glucógeno sintasa
GBE	Enzima ramificante
PGM	Fosfoglucomutasa
Glc	Glucosa
ADP	Difosfato de adenina
AMP	Monofosfato de adenina
G1,6BP	Glucosa 1,6 bisfosfato
PPi	Pirofosfato
Pi	Fosfato inorgánico
Vm	Velocidad máxima
Km	Afinidad enzimática

# Índice

Resumen.....	1
1. Introducción	
1.1 El Cáncer.....	3
1.2 Glucógeno.....	5
1.3 Glucogenogénesis y glucogenólisis.....	6
1.4 Enzimas responsables de la síntesis y degradación del glucógeno.....	9
1.5 Regulación metabólica y hormonal de la síntesis y degradación del glucógeno.....	12
1.6 Glucogenogénesis y glucogenólisis tumoral.....	15
2. Justificación e hipótesis	
2.1 Justificación.....	17
2.2 Hipótesis.....	18
3. Objetivos	
3.1 Objetivo General.....	19
3.2 Objetivos particulares.....	19
4. Material y métodos.....	20
5. Resultados.....	28
6. Discusión.....	39
7. Conclusiones.....	40
8. Apéndice.....	45
9. Referencias.....	47

## Resumen

El glucógeno es el polímero de glucosa que representa la reserva de energía y de esqueletos carbonados en mamíferos y otros organismos, ayudando a mantener las vías metabólicas activas en condiciones de estrés nutricional. En las células tumorales se reporta un aumento en la cantidad de glucógeno almacenado que correlaciona con el importante control que ejerce la glucogenólisis (20-60%) sobre el flujo de la glucólisis, aun cuando las células tumorales se encuentran sometidas a hipoxia o hipoglucemia (Marín-Hernández et al., 2011 y 2014).

Debido a la importancia del glucógeno en las células tumorales, en esta tesis se realizó la caracterización cinética de las enzimas que participan en la síntesis y en la degradación del glucógeno para dilucidar sitios de control y determinar si hay cambios en sus mecanismos de regulación, lo que podría considerarse para proponer posibles blancos terapéuticos.

Por lo anterior, en extractos citosólicos de células tumorales AS-30D y de hepatocitos de rata (ayunada y no ayunada) se determinaron los parámetros cinéticos de velocidad máxima ( $V_m$ ) y afinidad ( $K_m$ ) de las enzimas fosfoglucomutasa (PGM), UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP), glucógeno sintasa (GS) y glucógeno fosforilasa (GP) bajo condiciones cercanas a las fisiológicas (37 °C, pH=7, 120 mM KCl).

Los datos obtenidos indican que no hay diferencias entre los parámetros cinéticos de las enzimas PGM ( $V_m = 140 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg}$ ;  $K_{m_{G1P}} = 0.8 \text{ mM}$ ) y UGP ( $V_m = 19 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg}$ ;  $K_{m_{UDPG}} = 0.06 \text{ mM}$ ) entre ambos modelos (células tumorales y no tumorales), siendo sus actividades independientes de la condición nutricional

(ayuno y no ayuno de las ratas); sin embargo, en el caso de la GS de hepatocitos ( $V_m = 0.5 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg}$ ;  $K_{m_{\text{UDPG}}} = 2 \mu\text{M}$ ) se observó que el ayuno de las ratas tiene un efecto inhibitorio de la enzima, mientras que en la GS de AS-30D no se presenta tal efecto, exhibiendo además la presencia de dos isoformas de alta afinidad ( $K_{m_1 \text{ UDPG}} = 50 \text{ nM}$ ,  $K_{m_2 \text{ UDPG}} = 0.2 \text{ mM}$ ) que no se inhibieron con AMP (inhibidor fisiológico). Por otra parte, aunque los parámetros cinéticos de la GP fueron similares en ambos modelos ( $V_m = 5 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg}$ ;  $K_{m_{\text{glucógeno}}} = 0.4 \text{ mM}$ ), la actividad de esta enzima sólo se detectó en hepatocitos de ratas en ayuno, cuya actividad fue inhibida por glucosa (inhibidor fisiológico); no así para la GP de AS-30D, que requirió de la presencia de AMP ( $0.1 \text{ M}$ ) para manifestar su actividad, siendo esta independiente de la condición nutricional.

Estos resultados indican que en las células tumorales AS-30D se expresan isoformas de la GS y GP que son menos sensibles a sus inhibidores fisiológicos (AMP y glucosa), lo que sugiere cambios en sus mecanismos de regulación.

# 1. Introducción

## 1.1 El Cáncer

El cáncer es un conjunto de patologías en las que subyacen mutaciones genéticas que llevan a las células a procesos de proliferación, crecimiento y diseminación autónomos, causados por alteraciones en loci responsables de la regulación del ciclo celular. Estas involucran la activación de oncogenes como HGF, c-MYC, ERB, cilclina E; y la inhibición de genes supresores de tumores como p53, TGF- o BRCA (Robbins y Cotran, 2007; Trudy McKee, 2003; Vogelstein y Kinzer, 2004). Estos daños genéticos pueden adquirirse por la acción de agentes ambientales como sustancias químicas, radiaciones, virus, o pueden heredarse en la línea germinal. Como resultado, se manifiestan siete cambios clave: 1) autosuficiencia en las señales de crecimiento, 2) insensibilidad a las señales de inhibición de las mismas, 3) evasión de la apoptosis, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogenia mantenida, 6) capacidad para invadir y metastizar, y 7) defectos en la reparación del DNA (Loeb et al., 2003; Zhang et al., 2007; Weinberg, 2000).

Durante 2013, en México el cáncer ocupó el tercer lugar como causa de muerte, solo después de enfermedades del corazón y diabetes mellitus; para el caso de varones, el cáncer de próstata se registra como el de mayor mortandad, así como el de mama y útero en el caso de las mujeres (INEGI, 2013). La Organización Mundial de la Salud reporta que en 2012, las enfermedades no transmisibles causaron más del 68% de las muertes en el mundo, dentro de estas patologías, el cáncer ocupa el segundo lugar (OMS, 2015).

Una propiedad fundamental de las células tumorales es la reprogramación metabólica originada por los microambientes en los

que se desarrollan. Estos cambios originan una menor susceptibilidad a la quimioterapia y a la radiación, que son las terapias de elección en la actualidad, y que implican efectos secundarios adversos para el paciente, y no aseguran una eficacia completa (Gatenby y Gillies, 2007; Lunt y Vander Heiden, 2011). Es por eso que el estudio a nivel molecular entre células tumorales y no tumorales, resulta de gran interés, al representar una estrategia alternativa para proponer nuevas terapias dirigidas que aumenten la especificidad del tratamiento y disminuyan los efectos secundarios (Pelicano et al., 2006; Hornberg et al., 2007).

## 1.2 Metabolismo energético en células tumorales

Se sabe que, dada una reprogramación metabólica, las células tumorales poseen una glucólisis exacerbada para sostener su proliferación y el aporte de energía, incluso en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg (Warburg, 1956; Lunt y Vander Heiden, 2011) Sin embargo, existe evidencia experimental que demuestra que la fosforilación oxidativa hace una contribución significativa al suministro de ATP en muchos tipos de células tumorales bajo una variedad de condiciones, además de la utilización de sustratos oxidados por las mitocondrias normales, tales como aminoácidos y ácidos grasos (Moreno-Sánchez et al., 2014).

La mayor parte de las macromoléculas requeridas para la proliferación celular, así como para la generación de triglicéridos, fosfolípidos y varios aminoácidos, son generadas a partir de intermediarios glucolíticos (Bauer et al., 2005; Ward and Thompson, 2012), a la par, la producción de NADPH, a partir de glucosa-6 fosfato, funge como sistema antioxidante. Estas vías metabólicas se

ven favorecidas en células tumorales con una glucólisis incrementada, pues además de elevar la producción de ATP, y la tasa de crecimiento, les confiere resistencia a condiciones de estrés como la hipoxia y la hipoglucemia, generando un microambiente hostil para células vecinas normales al secretar gran cantidad de lactato, acidificando el medio e incrementando la posibilidad de metástasis (Gatenby y Gillies, 2004; Marín-Hernández et al., 2014; Lee et al., 2007; E. Zois & L. Harris, 2016).

El estudio cinético de la glucólisis revela que los puntos principales de control son: 1) la degradación de glucógeno > hexocinasa > hexosafosfato isomerasa, bajo hiper y normoglucemia (25mM y 5mM de glucosa), donde la degradación de glucógeno representa hasta un 70% del control (Marín-Hernández et al., 2014; Moreno-Sánchez, 2014), por lo que, si se logra identificar los puntos de control, podría proponerse una estrategia terapéutica en el tratamiento del cáncer.

## 1.2 Glucógeno

El glucógeno es el homopolisacárido ramificado, formado por residuos de glucosa unidos en enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 empleado por diversos organismos como reserva energética, que les permite a las células contender a situaciones de estrés nutricional y mantener la homeostasis (Young FG, 1957; Berg et al., 2002).

A diferencia de las proteínas, los polisacáridos no suelen tener masas moleculares definidas, pues las proteínas son sintetizadas por enzimas a partir de una cadena molde de RNA mensajero de secuencia y longitud definidas que son copia fiel del molde en ausencia de patologías; para el caso de los polisacáridos, su síntesis



y degradación dependen exclusivamente de las enzimas que catalizan su polimerización y la liberación de monómeros (Lehninger, 2014).

Defectos en la síntesis y degradación de glucógeno ocasionan problemas en el almacenamiento del mismo, conocidas como glucogenosis, que tienen consecuencias variadas, desde el impedimento para realizar ejercicios extenuantes, diabetes, hepatomegalia, o incluso la incompatibilidad con la vida (Stegelmeier et al., 1995; Andreu et al., 2007; Tang et al., 2003).

### 1.3 Glucogenogénesis y glucogenólisis (Figura 1.1)

La glucosa que ingresa a la célula a través del transportador de glucosa (GLUT), es tomada como sustrato por la hexocinasa (HK), y es fosforilada en el carbono 6, formando la glucosa 6-fosfato (G6P), que es un metabolito común para la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la síntesis de glucógeno. Esta última se vale de la fosfoglucomutasa (PGM) para transferir el grupo fosfato de la G6P, de la posición 6 a la 1 (el intermediario formado es la glucosa 1, 6 bis-fosfato), generando la glucosa 1 fosfato (G1P), sustrato de la UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP), la cual utiliza la molécula energética UTP, para generar un metabolito de alta energía, la UDP-glucosa (UDPG) sustrato de la glucógeno sintasa (GS) que añade un monómero de glucosa a un templado de glucógeno unido a la glucogenina, formando enlaces glucosídicos 1-4 y liberando UDP. Cuando la cadena polimérica se elonga entre 12 a 18 residuos de glucosa, la enzima ramificante (GBE) es activada, transfiriendo una glucosa de la posición 1-4 a la posición 1-6, generando un nuevo punto de elongación polimérica.

La glucogenólisis procede en dos pasos separados, por un lado, la glucógeno fosforilasa (GP) fosforolisa el enlace 1-4 del polímero glucosídico, liberando G1P en cada catálisis, que puede ser tomada por la PGM y convertida en G6P, para así alimentar las vías que dependen de ella; por otro lado, los enlaces en la posición 1-6 del glucógeno son reconocidos por la enzima desramificante, quien es capaz de romperlo, liberando moléculas de glucosa sin fosfato (Figura 1) (Potter, 1961; Danforth & Lion, 1964; Krebs et al., 1964; Meléndez-Heiva et al., 1993; Lehninger, 2014).

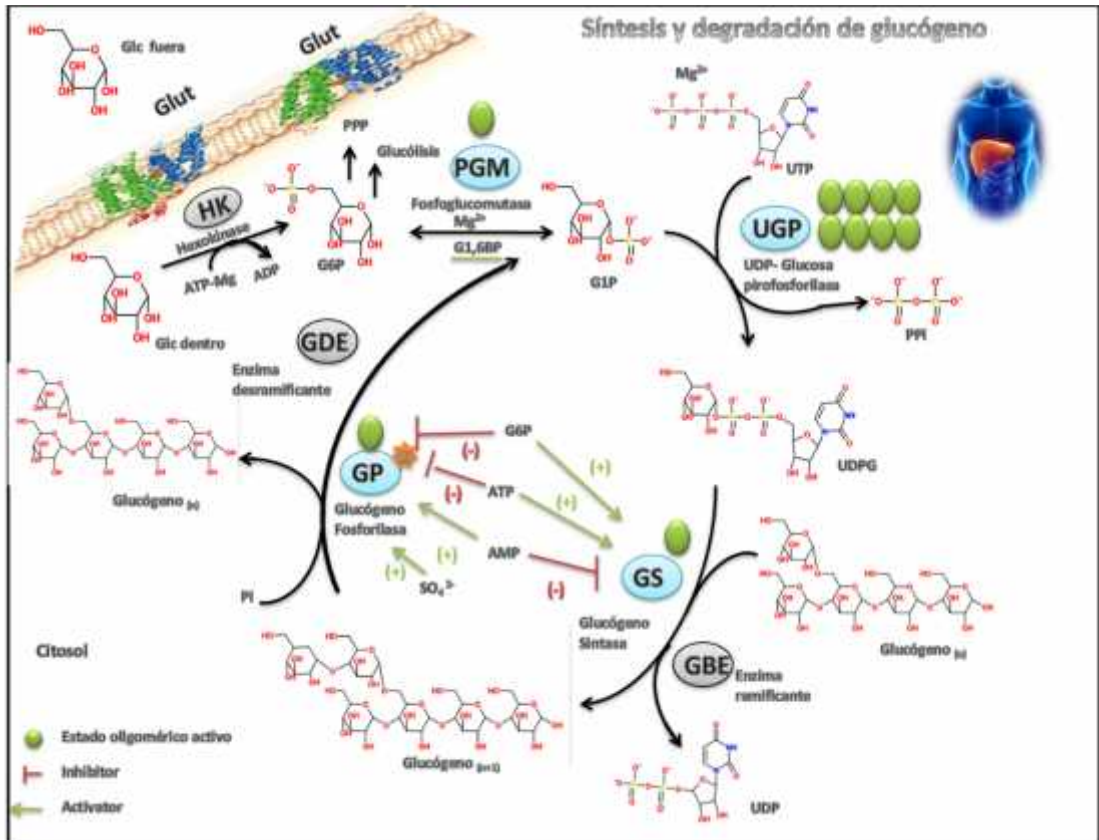


Figura 1. Vía de síntesis y degradación de glucógeno. Se muestran las enzimas involucradas en la conversión de metabolitos. Glc (glucosa), ATP (Trifosfato de Adenisina), ADP (Disfosfato de adenosina), AMP (Monofosfato de adenosina), G6P (glucosa 6-fosfato), PPP (Vía de las pentosas fosfato), G1,6BP (glucosa 1,6-bisfosfato), G1P (glucosa 1-fosfato), UTP (Trifosfato de uridina), PPI (pirofosfato), UDPG (UDP-glucosa), UDP (Difosfato de uridina),  $SO_4^{2-}$  (sulfato).

## 1.4 Enzimas responsables de la síntesis y degradación de glucógeno.

### Glucogenina (GYG)

La GYG es una enzima homodimérica capaz de autoglicosilarse hasta con 8 a 12 residuos de glucosa, los cuales une en enlaces 1-4, fungiendo como el templado para la cadena de glucógeno. Esta enzima presenta dos isoformas en el humano, GYG1 y GYG2; la primera con un tamaño de 39 kDa, y presente en el músculo prioritariamente, y la segunda de 55 kDa, expresada principalmente en el hígado. Emplea un ion divalente como cofactor, principalmente Magnesio, imprescindible para la acción del residuo específico de autoglicosilación: Tyr-195 en la GYG1 y el Tyr-228 en la GYG2 (Zeqiraj et al., 2015; Roach PJ, 2012; Pitcher et al., 1987).

### Fosfoglucomutasa (PGM)

La PGM es una enzima monomérica que se autofosforila en la serina de su sitio activo, emplea un catión divalente como cofactor, principalmente  $Mg^{2+}$ . En el humano, presenta tres isoformas, la muscular (PGMM), la hepática (PGMH) y la cerebral (PGMB), variando estas en sus valores de afinidad por el sustrato (Km) (Quick et al., 1973).

El mecanismo de acción de esta enzima involucra la fosforilación y posterior defosforilación del sustrato en pasos consecutivos. Inicialmente, la PGM reconoce a la G6P, fosforilándola en el carbono 1, formando a la glucosa 1, 6 bisfosfato (G1,6BP), intermediario y activador de la enzima; enseguida, tras un cambio conformacional, el fosfato de la posición 6 es retirado de la glucosa, formando finalmente a la G1P. En la reacción reversa el mecanismo es similar

variando en la posición de adición y retiro de fosfatos (Jagannathan et al., 1949; Hammond & Balinsky, 1978).

UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP).

La UGP es una enzima dimérica en su forma menos activa, mientras que, en presencia de su sustrato (G1P) se activa al octamerizarse. Para su catálisis emplea como cofactor al  $Mg^{2+}$ .

El mecanismo de reacción de esta enzima es bi-bi ping pong ordenado, teniendo como paso inicial el ingreso de la G1P, seguido del UTP que ataca a esta primera, liberándose entonces P<sub>i</sub> y posteriormente la UDP-Glucosa (UDPG), que es una molécula activa, como el ATP, capaz de mover la reacción de la enzima que la tome como sustrato. A pesar de que el  $\Delta G$  de esta reacción es cero en ambos sentidos, es la pirofosfatasa inorgánica quien, al tomar al pirofosfato y degradarlo a fosfato inorgánico, desplaza la reacción en el sentido de síntesis de UDPG (Kim et al., 2010; Berg et al., 2006).

Glucógeno sintasa (GS)

La GS es una enzima monomérica, activa en su forma defosforilada, capaz de unir monómeros de glucosa a un templado de glucógeno a partir de la transferencia de esta desde una molécula activa llamada UDP-glucosa, esto se realiza a partir de que la GS reconoce una cadena creciente de glucógeno (con 8 glucosas ensambladas en enlaces 1-4 glucosídicos, y unidas a la glucogenina, enzima que se autiglicosila en el hidroxilo de un residuo de tirosina, empleando UDPG como donante), y une entonces un monómero de glucosa en el extremo no reductor de la cadena polimérica, elongándola hasta un máximo de 18 residuos, pues es cuando la enzima ramificante

del glucógeno (GBE) transfiere un tetrámero glucosídico de la posición 1-4 a la posición 1-6, generando un nuevo sitio de elongación, haciendo manifiesta la eficiencia evolutiva de almacenamiento de glucógeno. Existen dos isoformas reportadas en la literatura en mamíferos, la GS muscular (GS1; 84 kDa) y la GS hepática (GS2, 81kDa; 703 aa), que a pesar de tener el 70 % de identidad, y ser reguladas por mecanismos de fosforilación y defosforilación mediados por diversas enzimas: PKA, PKC, PhK, AMPK, GSK3, CK (Figura 2); presentan variación en sus parámetros cinéticos y mecanismos de regulación. Mientras que la GS1 cuenta con 9 sitios de fosforilación descritos en mamíferos, se sabe que la GS2 solo presenta 7; los sitios no conservados por la GS2, y presentes en la GS1 (Ser<sup>697/698</sup> y Ser<sup>710/711</sup>) son regulados principalmente por la vía de PKA (Ferrer et al., 2003; Agius et al., 2010; Gomis et al., 2003; Baskaran et al., 2010). La G6P puede activar alostéricamente a la GS a través de su unión en el dominio de rico en arginina (Arg<sup>579-591</sup>), aún a pesar de que la enzima se encuentre completamente fosforilada, pues además de la modificación alostérica, la hace más susceptible a la defosforilación por fosfatasas (Gomis et al., 2003; Lawrence & Roach, 1997; Halse et al., 2001).

### Glucógeno fosforilasa (GP)

La GP es una enzima dimérica en su forma inactiva (GPb), al fosforilarse (GPa), principalmente en el residuo Ser15, se monomeriza, aumentando su actividad de fosforólisis. Esta enzima se une a una cadena de glucógeno con enlaces glucosídicos 1-4, fosforilando a la glucosa en la posición del carbono 1, liberando entonces G1P hasta el momento en que la última glucosa de la

ramificación (unida en enlace 1-6) es reconocida por la enzima desramificante (GDE), quien la desprende del polímero en forma de glucosa libre.

La GP presenta tres isoformas en mamíferos: la GP muscular la GP hepática, y la GP cerebral, las tres de aproximadamente 97 kDA (Marshall et al., 1978; Palm et al., 2012; Lehninger 2014). Se sabe que sus mecanismos de regulación son principalmente mediante fosforilación y ligantes alostéricos, aunque recientemente se ha descrito a la acetilación como un mecanismo de regulación negativa; mientras que el AMP, Pi y G1P promueven el estado R, la Glc, ATP, G6P y bases púricas estabilizan el estado T (Gaboriaud-Kolar & Skaltsounis, 2003; Agios, 2007 y 2015). Durante la actividad física la estimulación hormonal (Glucagon y epinefrina) activa a la Fosforilasa Kinasa (PhK), fosforilando y activando a la GP, sin embargo, se sabe que durante procesos tumorales, el aumento en la cantidad de citosinas puede implicar una desensibilización a los receptores, provocando que la regulación enzimática se limite a sus modificaciones alostéricas (Ramirez & Sanchez, 2001; Dandona et al., 2005; Canello y Clement, 2006; Bouloumie, 1992)

### 1.5 Regulación metabólica y hormonal de la síntesis y degradación del glucógeno (Figuras 1.2)

Las dos enzimas en las que se centra el control del metabolismo del glucógeno son la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa, las cuales son susceptibles de activación e inhibición por uniones covalentes (fosforilaciones) y la interacción con metabolitos. La GP es activa en su forma fosforilada (a) e inactiva en la defosforilada (b), caso contrario a la GS; por lo que la acción fosforilante de enzimas cinasas tienen un efecto concertado de activación de la

glucogenólisis al tiempo de inhibir la glucogenogénesis y viceversa (Meléndez-Heiva et al., 1996; Shulman et al., 1996; Roach et al., 2012)

Al disminuir los niveles de glucosa en la sangre, por abajo de 5 mM, las células del hígado liberan glucagón, que al unirse a su receptor (GCGR), asociado a una proteína G, activa a la adenilato ciclasa (ADCY), quien cicla al ATP, formando AMP cíclico (AMPc), activador de la proteína cinasa a (PKA), que fosforila a la glucógeno fosforilasa cinasa (PHK), responsable de fosforilar a su enzima blanco, glucógeno fosforilasa, activándola. La adrenalina tiene un mecanismo similar, luego de su unión a los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta_2$ . Sin embargo, su liberación ocurre en situaciones de alerta. Por otro lado, el AMP es capaz de unirse a la isoforma muscular de la GP, activándola, a la par que el calcio puede activar a la GPK y esta a su vez fosforilar a la GP; mientras que la G6P es un inhibidor de la misma, a la par del ATP, que es capaz de inhibir la casada de señalización que lleva a su fosforilación.

Cuando la concentración de glucosa es superior a 5 mM, son las células de los islotes de Langerhans las encargadas de liberar insulina, para que al unirse a su receptor (INSR), este se fosforile y adquiera la propiedad de tirosina cinasa, fosforilando a su vez a los residuos del receptor de insulina, promoviendo su asociación con fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), que convierte al fosfatidil inositol 4, 5 bis fosfato (PIP2) en fosfatidil inositol 3, 4, 5 tri fosfato (PIP3), que es capaz de activar a la cinasa dependiente de fosfatidil inositol (PDK), la cual fosforila a la proteína cinasa B (PKB), promoviendo la liberación de transportadores GLUT que permiten la entrada de glucosa a la célula, y activan la síntesis de glucógeno por un



aumento en la concentración de la G6P, modulador alostérico de la GS (activador) y de la GP (inhibidor). PKB también activa a la fosfodiesterasa, enzima responsable de convertir el AMPc en AMP lineal; promueve la activación de la fosfatasa, enzima que defosforila proteínas, como la GS y la GP (lo que lleva a su activación e inhibición respectivamente); y por otra parte fosforila a la glucógeno sintasa cinasa (GSK), inactivándola, por tanto, impidiendo la inactivación de la GS por fosforilación. Los inhibidores de la GS son, el AMP y el calcio, capaces de activar el proceso de fosforilación de la PKA y PKB; sus activadores son la G6P y el ATP.

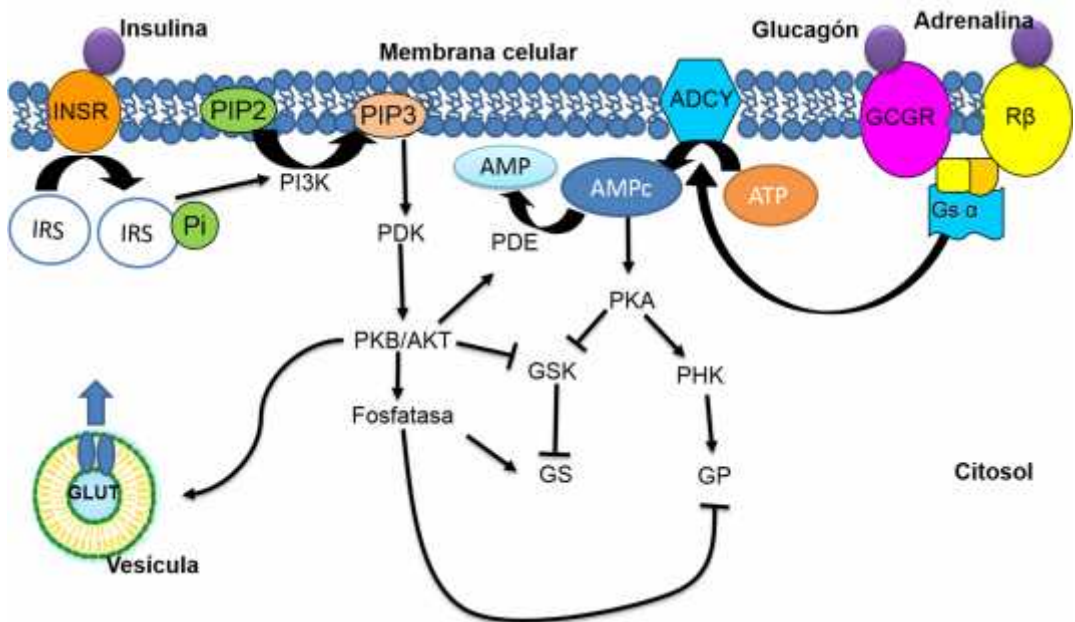


Figura 1.2. Regulación hormonal de las vías de síntesis y degradación del glucógeno centradas en la regulación de la glucógeno sintasa (GS) y la glucógeno fosforilasa (GP). La descripción se encuentra en el texto. INSR: Receptor de insulina; ADCY: Adenilato ciclasa; GCGR: Receptor de glucagón; R : Receptor adrenérgico; Gs : Subunidad de proteína G asociada; PKA: Proteína cinasa A; IRS: Residuo de insulina; PIP2: Fosfatidil

inositol 4,5 bisfosfato; PIP3: Fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfato; PI3K: Fosfatidil inositol-3 cinasa; GLUT: Transportador de glucosa; PDK: Cinasa dependiente de fosfatidil inositol; PKB: Proteína cinasa B; AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico; AMP: Monofosfato de adenosina lineal; GSK: Glucógeno sintasa cinasa; PHK: Glucógeno fosforilasa cinasa.

## 1.6 Glucogenogénesis y glucogenólisis tumoral

Es bien sabido que una de las alteraciones más notorias del metabolismo de células tumorales, respecto a las normales, es el incremento en la vía glucolítica, incluso cuando la mitocondria se encuentre dañada, o bien, cuando estas se encuentran sometidas a hipoxia (Xu et al., 2005; Marín-Hernández et al., 2014; Zips et al., 2004). Aunado a esto, se ha reportado evidencia del aumento de la cantidad de glucógeno en células tumorales en comparación con las normales, así como el incremento en la cantidad y actividad de las enzimas reguladoras de las vías de síntesis y degradación de este metabolito, la GP y la GS (Mayer & Bannasch, 1988; Pescador et al., 2010), lo que explicaría la capacidad de contender ante situaciones de estrés como la hipoxia e hipoglucemia a la que se encuentran sometidas las células cancerosas en un tumor sólido (Favaro et al., 2012).

En estudios anteriores se ha demostrado que el aumento en la capacidad glucolítica de las células tumorales se debe en gran parte a la expresión de isoformas más eficientes de las enzimas controladoras de esta vía, como lo son, el transportador de glucosa (GLUT), y la hexocinasa (HK), aumentando el flujo glucolítico (Marin-Hernandez et al., 2014). Dado que la glucogenólisis controla la glucólisis de un 20 a un 70 % el flujo en la glucólisis tumoral en

condiciones de normo e hiperglucemia, sugiere que se expresan isoformas de alta afinidad, capaces de sintetizar y degradar el glucógeno de forma que lleve a las células tumorales a contender a las situaciones de estrés nutricional de manera más eficiente a las células normales.

## 2. Justificación e hipótesis

### 2.1 Justificación

Debido a que la glucogenólisis en las células tumorales ejerce un importante control en el flujo glucolítico, y el glucógeno les permite contender de manera más eficiente a condiciones de estrés nutricional, en esta tesis se consideró realizar la caracterización cinética de las enzimas que participan en la síntesis y en la degradación del glucógeno en células tumorales para determinar si hay cambios en sus mecanismos de regulación. Esto permitirá realizar el modelado cinético de la vía, así como contribuir a la propuesta de nuevos blancos terapéuticos.

## 2.2 Hipótesis

Las enzimas GP y GS que se expresan en células tumorales presentan cambios en sus mecanismos de regulación metabólica y hormonal con respecto a las enzimas que se expresan en células normales.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo General

Realizar la caracterización cinética de las enzimas responsables de la síntesis y degradación de glucógeno en células tumorales y compararlas con su tejido de origen.

#### 3.2 Objetivos particulares

Determinar los parámetros cinéticos ( $V_m$  y  $K_m$ ) de las enzimas PGM, UGP, GS y GS en extractos clarificados de células tumorales (AS-30D) y normales (hepatocitos).

Determinar el efecto de activadores e inhibidores de las enzimas GP y GS en células tumorales y normales.

## 4. Material y métodos

### Aislamiento de células AS-30D

Células AS-30D de hepatocarcinoma (Aprox.  $4 \times 10^8$  células/mL) fueron propagadas en ratas wistar hembras (200g) por transplatación intraperitoneal. Pasados 8 días de proliferación, las ratas fueron sacrificadas para extraer el líquido ascítico en el que se encontraban inmersas las células tumorales. Esta suspensión fue centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos para precipitar el contenido celular, este fue resuspendido en medio Ringer Krebs y centrifugado nuevamente disminuyendo el tiempo a 2 min y la velocidad en 150 rpm menos en cada ocasión hasta obtener un botón blanquecino.

### Extracción de glucógeno hepático

Se extrajo el hígado de ratas wistar macho (500g), sanas, no ayunadas por disección. Se colocó en una solución de KOH 30% (3mL/g de hígado) y se llevó a ebullición con agitación constante por 30 min; una vez desnaturalizado por completo, se enfrió en hielo para luego adicionar etanol absoluto (4mL/g de hígado), recuperando el precipitado por centrifugación a 2000 x g, disolviéndolo en agua (1mL/g de hígado) y precipitando de nuevo con alcohol absoluto (3mL/mL de agua) con la finalidad de lavarlo, este paso se repitió una vez más para obtener un precipitado blanco (glucógeno hepático). Éste fue disuelto en un volumen mínimo de agua para ser cuantificado y utilizado como reactivo.

### Cuantificación de glucógeno

Se hicieron diluciones 1:100 de tres alícuotas de la suspensión total de glucógeno, colocando 10  $\mu$  de esta en 500 $\mu$ L de acetato de sodio 0.2M (pH 4.8) que contenía 5U de amiloglucosidasa, dejándola

actuar a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se neutralizó y se determinó el contenido de glucosa libre (Glc) mediante el siguiente sistema acoplante:

En la celda de reacción se colocó NADP<sup>+</sup> 0.5mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM de hexocinasa (HK) 1U, ATP 5mM, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) 1U y se arrancó la reacción con 10 μL de la mezcla de con amiloglucosidasa. Se monitoreó la generación de NADPH a 340nm con la concomitante aparición de 6-fosfoglucono- lactona (6PG).



Figura 4.1. Sistema acoplante para determinar la concentración de glucosa (Glc) mediante la aparición de NADPH detectado a 340nm en una celda de reacción.

### Actividades enzimáticas

Se determinó la actividad de las enzimas fosfoglucomutasa (PGM), UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP), glucógeno sintasa (GS) y glucógeno fosforilasa (GS) en extractos celulares obtenidos de la siguiente manera:

Luego de los lavados necesarios, 60 mg de proteína celular (cuantificada por el método de Biuret, Apéndice A) se





presencia de concentraciones variables de G1P (0.25-10 mM). Además se estudió el comportamiento de la enzima en presencia de su activador, la glucosa 1, 6 bisfosfato (G1,6BP) a diferentes concentraciones (2-5 $\mu$ M).

#### UDP-glucógeno pirofosforilasa (UGP)

La actividad de esta enzima se determinó en su sentido reverso a la síntesis de glucógeno, adicionando en la celda de reacción pirofosfato (PPi) 2mM, 1U de PGM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, 1 U de G6PDH, 0.2-0.5mG de proteína del extracto celular clarificado y NADP<sup>+</sup> 0.5mM. La reacción inició al añadir UDP-Glucosa (UDPG) como reactivo (Figura 4.3)

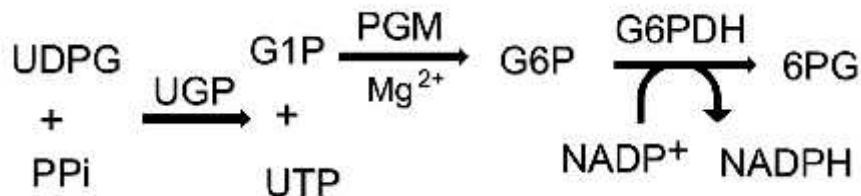


Figura 4.3. Sistema acoplante para determinar la actividad de la UGP mediante la aparición de NADPH detectado a 340nm en una celda de reacción.

#### Glucógeno sintasa (GS)

Para determinar la actividad de la GS, se colocó en la celda de reacción Piruvato Cinasa (PYK) 1U, Fosfoenolpiruvato (PEP) 0.3mM, Glucógeno (GG) 0.1mM, ATP 5mM, NADH 0.5 mM y 0.02-0.05mg de proteína. La reacción fue iniciada al adicionar UDP-glucosa (0.25-12mM), y se monitoreó el consumo de NADH a 340nm (Figura 4.4). Para observar la regulación hormonal de la enzima, las ratas sanas

como las cancerosas, fueron puestas en ayuno por 24 h previo a la extracción de las células hepáticas o tumorales.

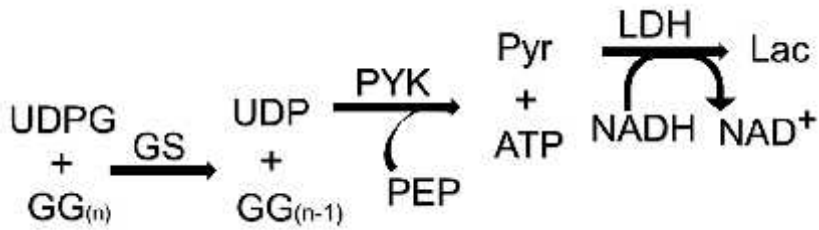


Figura 4.4. Sistema acoplante para determinar la actividad glucógeno sintasa (GS) mediante la aparición de NADPH detectado a 340nm en una celda de reacción.

#### Glucógeno fosforilasa

La actividad de esta enzima se determinó en presencia de glucógeno 0.1mM, PGM 1U, MgCl<sub>2</sub> 2mM, G6PDH 1U, 0.02-0.05mg de proteína de extracto celular clarificado, la reacción fue iniciada al adicionar concentraciones variables (0.5-100mM) de fosfato (Pi). Además, se adicionó AMP 0.1mM para evaluar su función como activador; y por otro lado, para observar la regulación hormonal de las enzimas, las ratas sanas como cancerosas, fueron puestas en ayuno por 24h previo a la extracción de las células y del hígado. Figura 4.5.

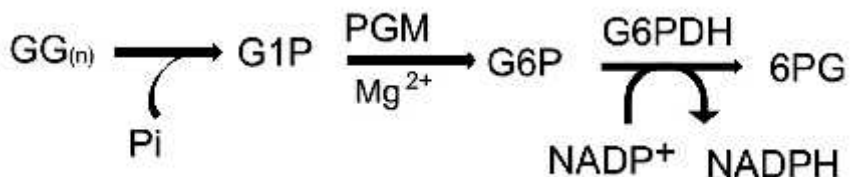


Figura 4.5. Sistema acoplante para determinar la actividad de la glucógeno fosforilasa (GP) mediante la aparición de NADPH detectado a 340nm en una celda de reacción.

Cálculos

Para determinar la concentración de glucosa se emplearon los datos de absorbancia al inicio y final de la reacción (Figura 4.6). Considerando la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Donde:

A = Absorbancia;

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción, igual a  $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el NAD(P)H;

l = longitud de paso óptico en la celda (1cm).

Despejando la concentración de la fórmula anterior, habiendo utilizado cubetas de 2 mL, considerando  $A = (1.3564) - (1.2578)$  y sabiendo que cada mol de NAD(P)H detectado corresponde a un mol de glucosa consumido, tenemos:

$$c = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l}$$

Entonces:

$$G = \frac{(0.0986)(0.002L)}{\left(6.22L * m^{-1} N^{-1} (P)H \cdot -1 \frac{m}{m} \frac{N}{m} (P)H\right) (1c)} = 3.17 \times 10^{-5} m \cdot G$$

Por último se consideran los factores de dilución correspondiente, obteniendo:

$$[G] = \frac{3.17 \times 10^{-5} \text{ m}_G}{10 \mu} \frac{100 \mu}{1 \mu} \frac{1 \text{ n}_G}{1 \times 10^{-6} \text{ m}_G} = 3.17 \text{ m}$$

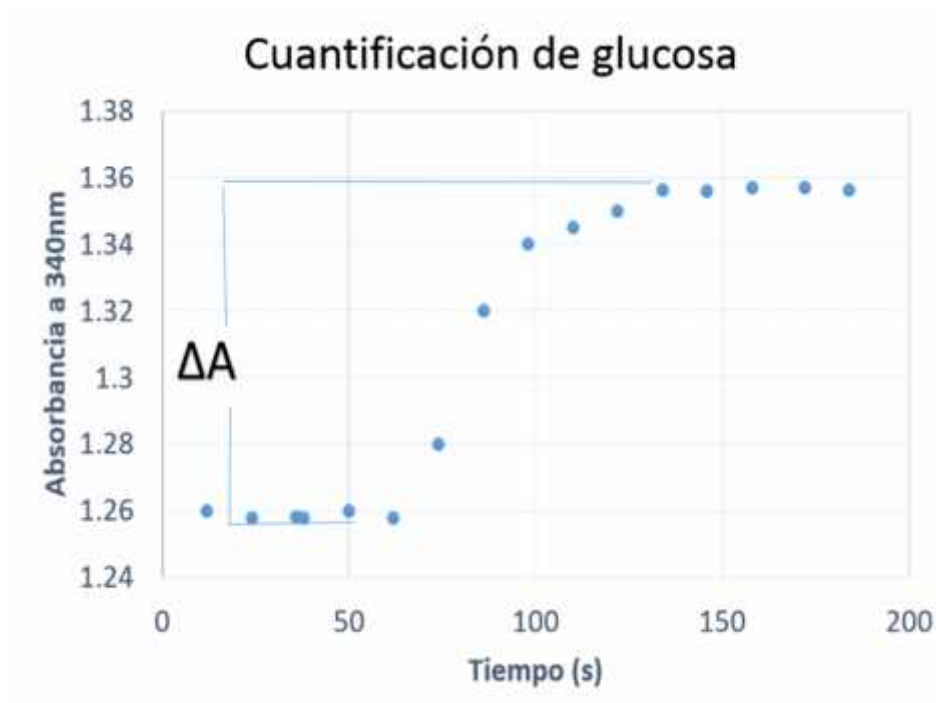


Figura 4.6. Esquema representativo del monitoreo de la aparición de NAD(P)H en la celda de reacción para la cuantificación de glucosa mediante un sistema acoplante de enzimas.

Para el cálculo de velocidad enzimática, se emplearon los datos de absorbancia a través del tiempo ( Abs vs t) en condiciones iniciales, obteniendo los gráficos correspondientes. Figura 4.7

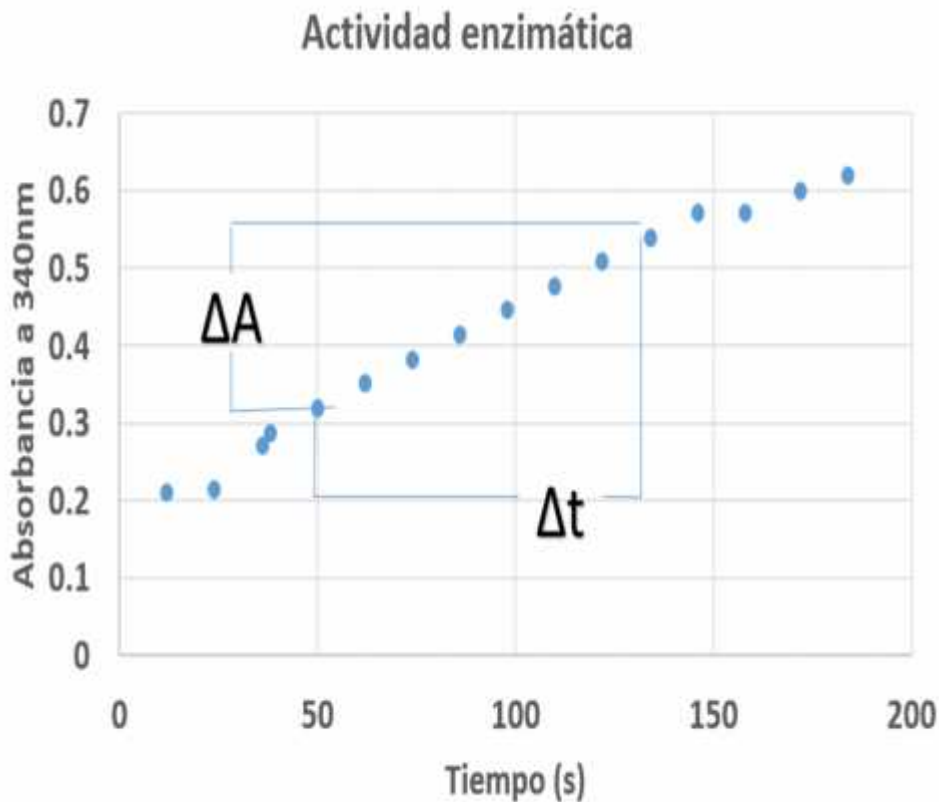
Considerando:

$$v = \frac{\Delta}{\epsilon \cdot \Delta \cdot p} \frac{1}{\ln (m)}$$

$$v\left(\frac{n}{m \cdot m \cdot p}\right) = \frac{(0.0986)(0.002L)}{\left(6.22L \cdot m \cdot N^{-1} \cdot (P)H \cdot C \cdot -1 \frac{m \cdot N \cdot (P)H}{m \cdot G}\right)} (1C \cdot )$$

$$= 3.17 \times 10^{-5} m \cdot G$$

Figura 4.7. Monitoreo de velocidad enzimática a partir del cambio de absorbancia a 340nm por la aparición de NAD(P)H a través del tiempo.



## 5. Resultados

### Glucógeno fosforilasa

#### GP de Hepatocitos

La actividad de la GP en hepatocitos de rata sana se observa solo en la condición en que la rata se encuentra en ayuno, exhibiendo su regulación hormonal ante esta condición de estrés. Su comportamiento fue de tipo Michaelis-Menten, arrojando los datos de  $V_m$  y  $K_m$  mostrados en el gráfico (Fig. 5.1) obtenidos a partir del ajuste no lineal de los valores de actividad. Para la condición en que la rata mantuvo su alimentación, no fue posible detectar la actividad de esta enzima.

#### GP de AS-30D

Para observar la actividad de la GP tumoral, se empleó glucógeno 1mM en equivalentes de glucosa (considerando solubilidad y turbidez), variando la concentración de fosfato (0-100 mM) además se adicionó una concentración de 0.1mM de AMP a la celda de reacción, pues de lo contrario no se logró detectar actividad. Los parámetros cinéticos mostrados ( $k_m$  y  $V_m$ ) fueron independientes de la condición de ayuno en la rata, realizando mediciones por triplicado para cada condición (ayuno y no ayuno) Los valores de velocidad se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten, arrojando los datos mostrados en el gráfico (Fig. 5.2).

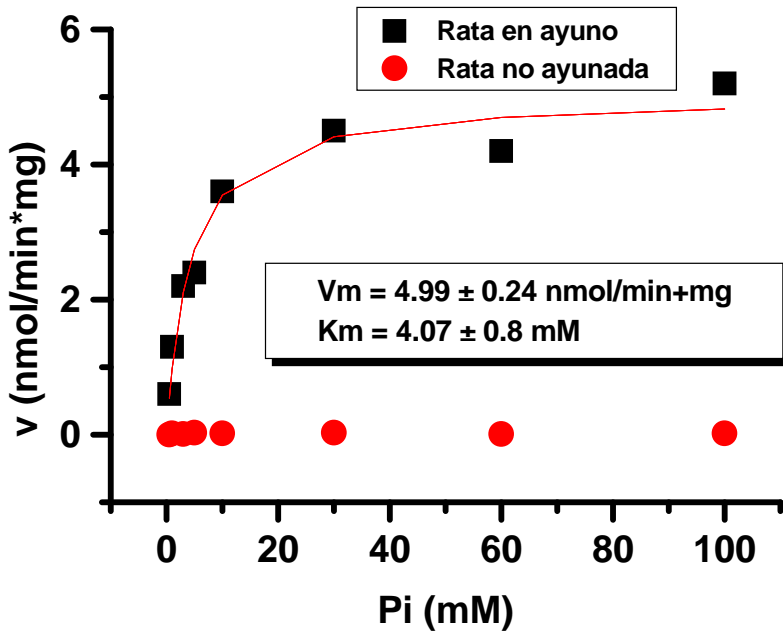
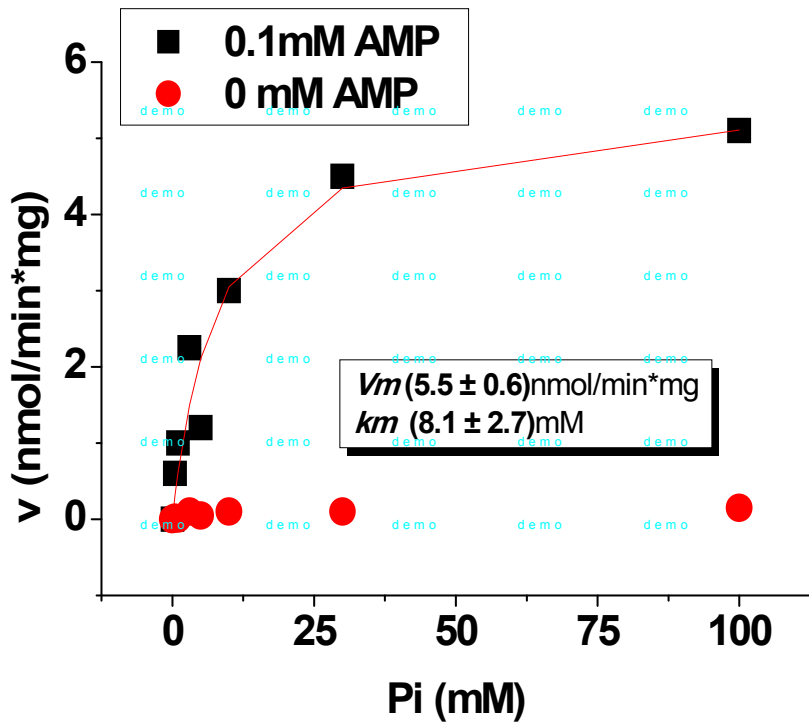


Figura 5.1.





Efecto inhibitorio de la glucosa sobre la GP hepática.

Para determinar los parámetros cinéticos de la GP de hepatocito de rata sana con respecto al glucógeno, se adicionó una concentración de fosfato saturante (100 mM) según la literatura y una aproximación realizada previamente. Aunado a esto, se adicionaron concentraciones crecientes de glucosa (No se empleó G6P ya que el sistema acoplante incluye G6PDH) para observar su efecto inhibitorio, una concentración de glucosa de 5 mM indujo una disminución del 50 % en la velocidad máxima de la enzima, sin modificar su valor de Km.

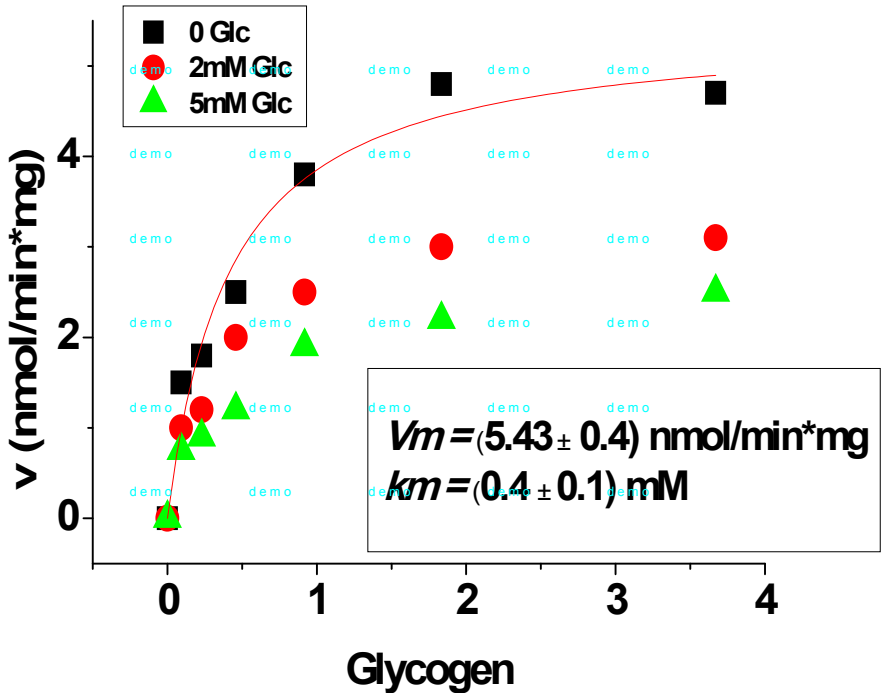
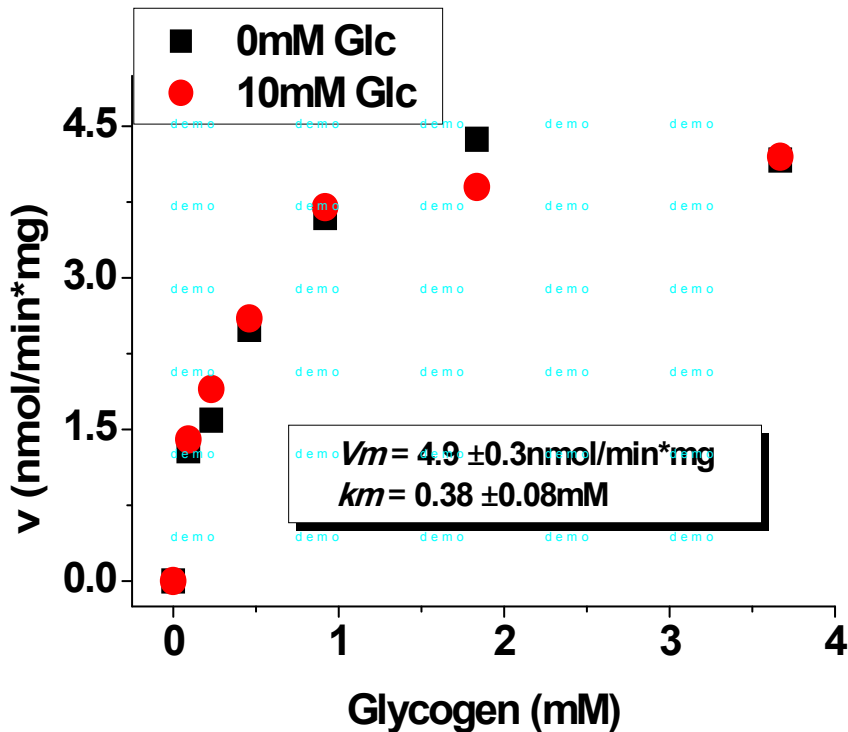


Figura 5.2.

## Efecto inhibitorio de la glucosa sobre la GP tumoral

Para determinar los parámetros cinéticos de la glucógeno fosforilasa en células tumorales AS-30D, con respecto a glucógeno, se colocó una concentración de 100 mM de fosfato (concentración saturante) en la celda de reacción (saturante), además de AMP 0.1mM (activador esencial en la GP tumoral). Posteriormente, se añadieron concentraciones crecientes de glucosa para observar su efecto inhibitorio, sin embargo, esta no tuvo efecto sobre ninguno de los parámetros ( $V_m$  y  $K_m$ ) aún en una concentración de 10 mM. El experimento se realizó por triplicado y los resultados fueron independientes de la condición de ayuno de las ratas cancerosas.



## FOSFOGLUCOMUTASA

Actividad de la fosfoglucomutasa en hepatocitos de rata sana.

Al evaluar a la PGM hepática, se hizo en el sentido de síntesis de glucógeno (de G6P). Observamos que fue activada por la glucosa 1,6 bis-fosfato (G1,6BP) a una concentración máxima de  $2\mu\text{M}$  y una concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  de  $2\text{mM}$ , una concentración más alta de cualquiera de estos dos activadores indujo una inhibición de la actividad enzimática. La G1,6BP aumenta la afinidad de la enzima por su sustrato, disminuyendo el valor de la  $K_m$ ; los cambios en la  $V_m$  son observables, pero no significativos, además de que a una concentración mayor del sustrato se observa una disminución en la

actividad.

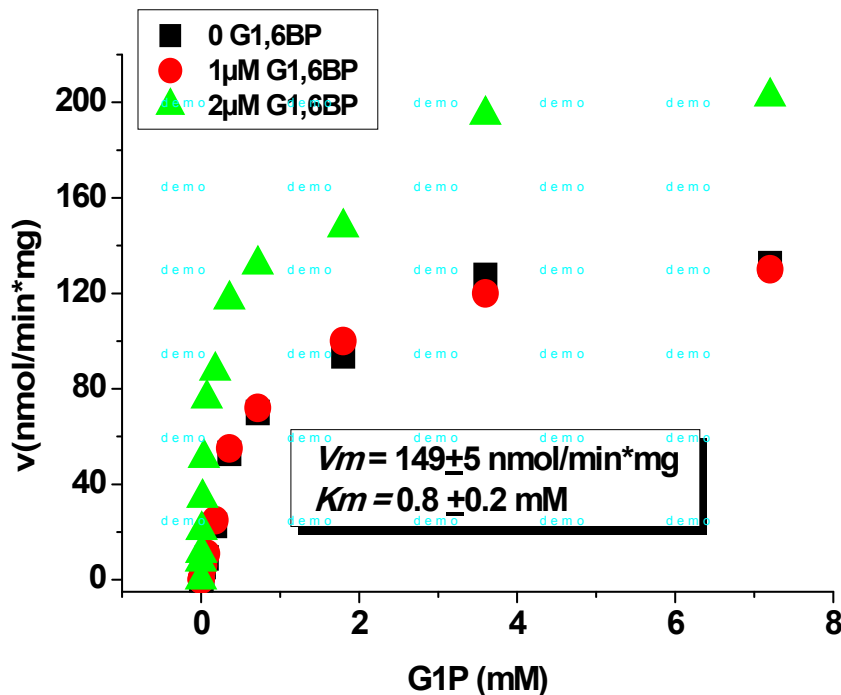


Figura 5.5. Los datos presentados corresponden a la curva sin activador, con una n=3.

Actividad de la fosfoglucomutasa en células AS-30D.

La PGM tumoral exhibe una cinética similar a la de células normales (Figura 5.5), donde observamos una enzima rápida, tipo Michaelis-Menten, con un activador no esencial tipo  $K$ , la G16BP. Se muestran los parámetros cinéticos de la PGM sin activador, con una concentración de 2mM de  $Mg^{2+}$ , cofactor esencial para la actividad de la enzima. Una concentración superior a 2 μM de G1,6BP y/o de  $Mg^{2+}$  resulta en la inhibición de la enzima. El potasio en el medio parece tener un efecto favorable en la eficiencia catalítica de la enzima con respecto a datos reportados con anterioridad obtenidos en ausencia de este catión (Marín-Hernández, 2014).

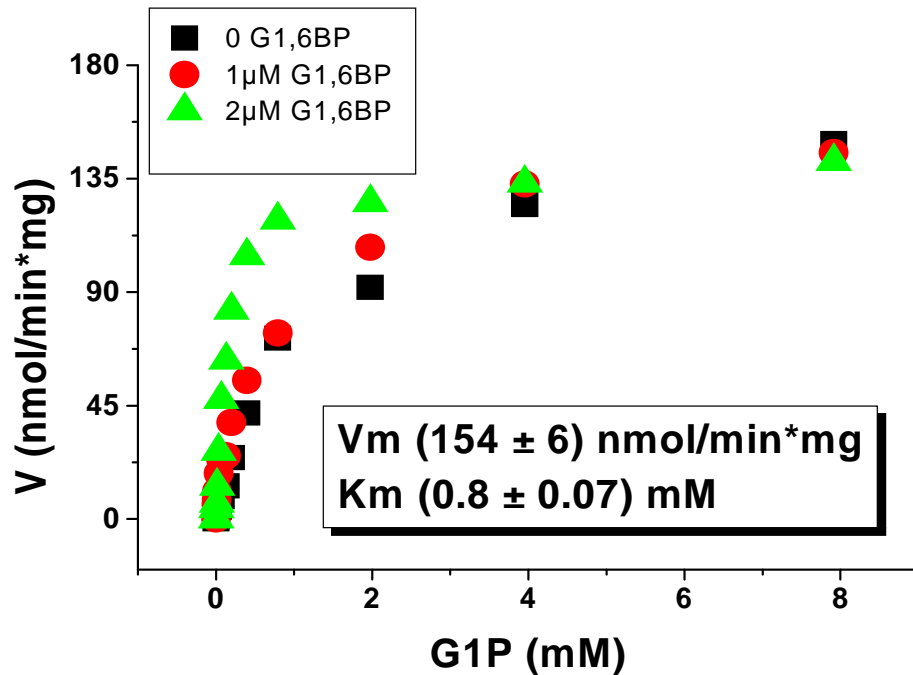


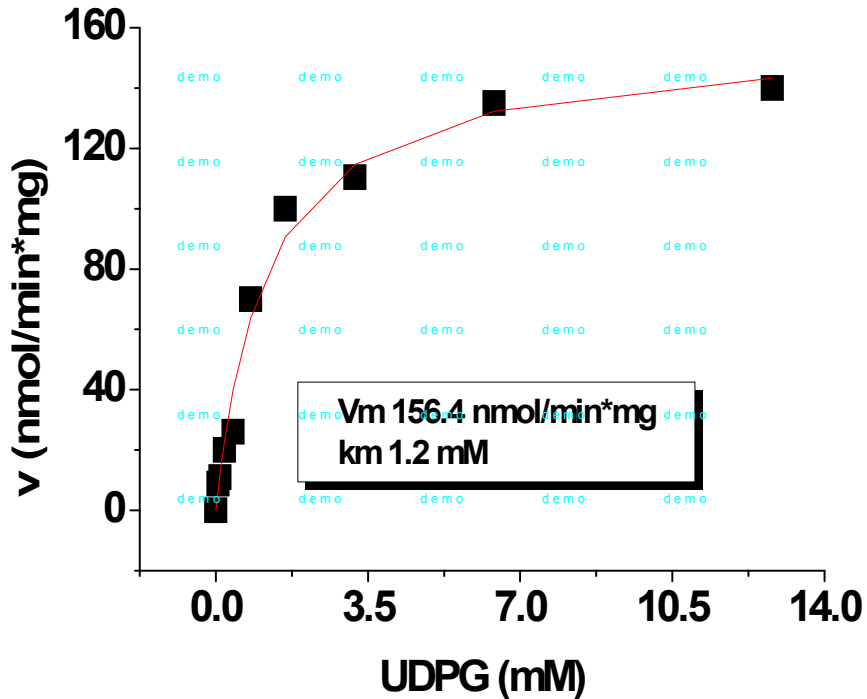
Figura 5.6. La n=5. Título y bla

UDP-Glucosa pirofosforilasa

Actividad de la enzima UGP hepática en ratas sanas.

Figura 5.7. La actividad de la UGP fue determinada en el sentido reverso a la síntesis de glucógeno, incubando con concentraciones crecientes de UDPG durante 10 min y empleando pirofosfato (PPi)

(2mM) como reactivo de arranque.



Actividad enzimática de la UGP de células AS-30D.

Se determinó la actividad de la UGP tumoral como se describe en la figura 5.7. Los parámetros cinéticos fueron determinados en dos muestras, y coinciden con los hallados en células normales, se muestra el promedio de estas mediciones y una de las gráficas obtenidas. El  $Mg^{2+}$  resultó ser esencial para exhibir la actividad, dado que el sustrato real es PPI-Mg, una concentración mayor del catión o del pirofosfato precipita. Se requirió incubación previa con

UDPG dado que se trata de una enzima octamérica y el mecanismo de reacción es bi-bi ordenado.

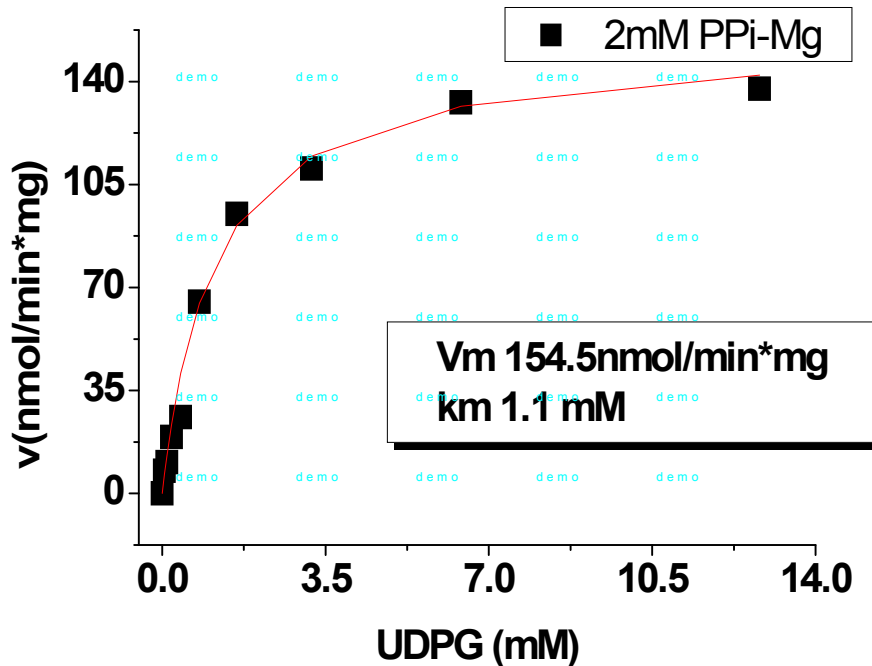


Figura 5.8.

### Glucógeno Sintasa

Actividad de la Glucógeno sintasa en hepatocitos de rata sana

Para poder elucidar la actividad de la GS hepática las ratas mantuvieron su dieta habitual, pues al ayunarlas la actividad no pudo ser detectada, lo que exhibe el control hormonal ante condiciones de estrés nutricional que posee esta enzima. Se trata de una enzima tipo M-M lenta pero súmamente sensible a su sustrato (UDPG) con una  $K_m = 2 \mu\text{M}$ . Se observó una sola isoforma,

confirmado en un gráfico de Scatchard (Figura 5.11a).

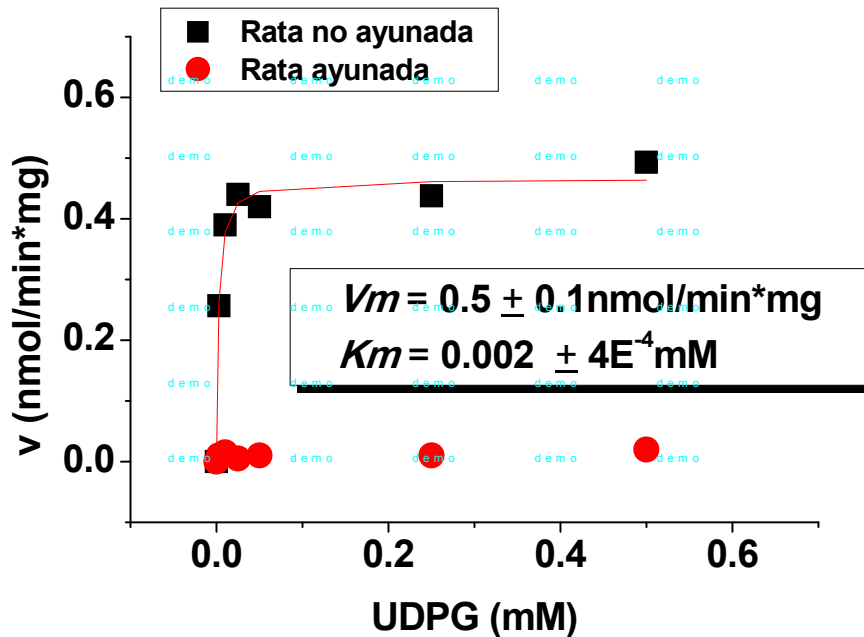


Figura 5.9. Los datos mostrados corresponden al promedio de dos mediciones, y los gráficos son representativos de una de cada una de las determinaciones.

### Actividad de la Glucógeno Sintasa en células AS-30D

La GS tumoral mostró actividad independientemente de la condición nutricional de la rata (ayuno o no ayuno), lo que indicó una independencia del control hormonal al que se encuentra la GS hepática de células normales. Se observó el comportamiento cinético, exhibiendo la presencia de dos isoformas de alta afinidad,



confirmadas por los regráficos de scartchard (Figura 6.11b).

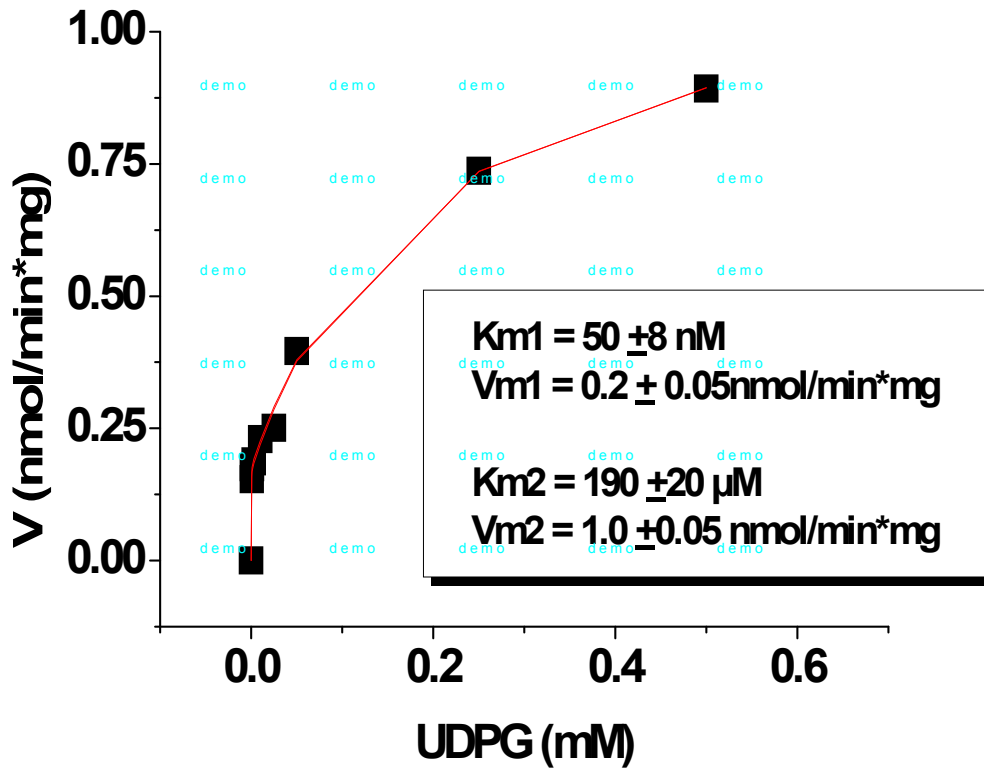


Figura 5.10. Los datos mostrados corresponden a una  $n=3$ .

Regráficos de Scatchard de GS hepática y tumoral.

Figura 5.10<sup>a</sup>. Regráfico de Scatchard GS hepática. Se observa el comportamiento de una solo isoforma de GS con una pendiente e

intersección al origen (Una sola isoforma).

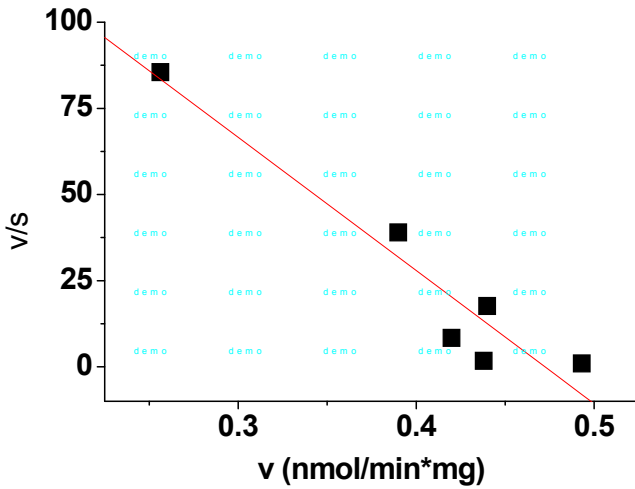
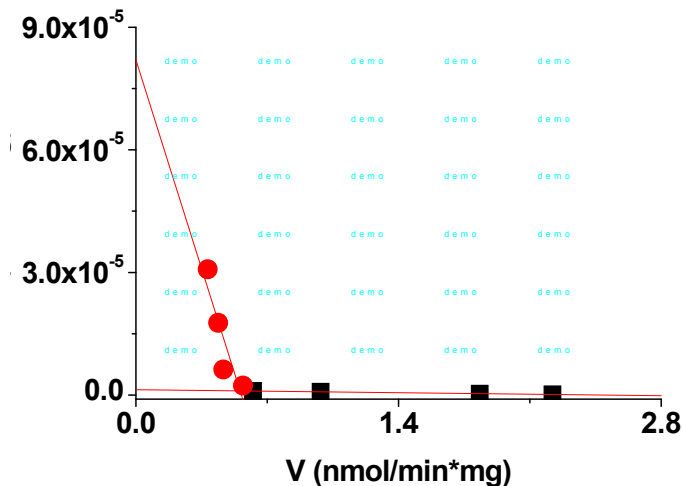


Figura 5.11b. Re gráfico de Scatchar para la GS tumoral. Se observa la presencia de dos isoformas de alta afinidad al presentar dos pendientes y dos intersecciones en el eje de las ordenadas (dos isoformas con  $K_m$  y  $V_m$  distintas).



## 6. Discusión.

Debido a que la tasa de crecimiento de las células tumorales es superior al de las células normales de su tejido de origen, estas primeras se encuentran sometidas a oleadas nutricionales que generan un estrés al cual contender para lograr sobrevivir. Las dos condiciones principales que se manifiestan, principalmente en los centros quiascentes de los tumores sólidos son la hipoxia y la hipoglucemia, condiciones que han llevado a las células a desarrollar mecanismos de supervivencia como la expresión de isoformas enzimáticas glucolíticas de mayor eficiencia catalítica, y el incremento en la cantidad de proteínas que representen una ventaja ante las condiciones ya mencionadas. Estos cambios son mediados en gran parte por el factor inducible por hipoxia (HIF), que tiene como blanco a los loci de estas proteínas (Marín-Hernández et al., 2014). Se ha sugerido que la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa son también blanco de HIF-1 , pues se ha observado que en zonas hipóxicas de tumores sólidos el RNAm de estas se enzimas se encuentra incrementado, así como la cantidad de proteína evaluada por Western-Blot (Favaro et al., 2012), sin embargo, hemos de recordar que cambios en la expresión génica no implica directamente la modificación en la cantidad de proteína, y a esta a su vez no significa cambio en la actividad enzimática, por ello el estudio cinético ofrece una visión más certera de la modificación metabólica que ocurre en las células. A este respecto se presenta a continuación la tabla resumen de los parámetros cinéticos encontrados para las cuatro enzimas evaluadas:

**Tabla resumen**

Enzima	AS-30D			HEPATOCITOS			REPORTADO		
	V <sub>m</sub> (μmol/min/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>m</sub> /K <sub>m</sub> (μmol/min/mg/mM)	V <sub>m</sub> (μmol/min/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>m</sub> /K <sub>m</sub> (μmol/min/mg/mM)	V <sub>m</sub> (μmol/min/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>m</sub> /K <sub>m</sub> (μmol/min/mg/mM)
PGM	123 (3)	0.8 (3)	154 (3)	119 (3)	0.8 (3)	1186 (3)	30 100 120	0.027, 1.9, 30	1100, 52, 3
UGP	151.6 (2)	1.1 (2)	140.5 (2)	156.1 (2)	1.2 (2)	130.3 (2)	NR	NR	NR
GP★	4.9 (4)	0.38 (4)	13 (4)	5.4 (3)	0.4 (3)	13.5 (3)	6	0.4	15
GS1★	0.2 (3)	50-5 (3)	4000 (3)	ND	ND	ND	NR	NR	NR
GS2	1 (3)	0.19 (3)	5 (3)	0.5 (2)	2F 2 (2)	250	0.5	2E-1	250

**ND = No detectado**  
**NR = No Reportado**

Brenda-enzymes.org

La fosfoglucomutasa tumoral no mostró cambios en sus parámetros cinéticos con respecto a los de la PGM de células sanas, sin embargo, aunque no sea fisiológicamente significativo, presenta una menor sensibilidad a la inhibición por sustrato a concentraciones superiores a 10 mM. Los valores determinados son similares a los reportados en la literatura en cuanto a orden, sin embargo, la velocidad máxima es mayor a la observada en trabajos anteriores a los de este mismo grupo (Marín Hernández et al., 2009), notando que la diferencia en las determinaciones fue el empleo de un medio con potasio, el cual es un activador de esta enzima.

La UDP-glucosa pirofosforilasa requirió la incubación previa con uno de sus sustratos (UDP-glucosa), para la octamerización de la enzima. Los parámetros cinéticos hallados corresponden a una enzima rápida en el sentido reverso a la síntesis de glucógeno. Sabemos que la entalpía de esta reacción es cero, por lo que podríamos pensar que los valores de K<sub>m</sub> y V<sub>m</sub> podrían ser similares

en el otro sentido, pues de hecho es la pirofosfatasa quien desplaza el equilibrio manteniendo el flujo hacia la glucogenogénesis.

La glucógeno fosforilasa exhibe, tanto para la célula tumoral como la normal, una cinética lenta de baja eficiencia catalítica, lo que puede interpretarse como la enzima una enzima limitante en el proceso de degradación glucogenolítica. Para el caso de la GP tumoral observamos la insensibilidad ante su inhibidor metabólico (Glucosa) y la dependencia de un activador esencial (AMP) en un cantidad mínima de 0.1mM, pero que no manifiesta un mayor efecto al incrementar dicha concentración. Esta enzima también hace evidente que se trata de una isoforma diferente a la de células hepáticas de ratas sanas al presentar actividad catalítica independientemente de la condición nutricional del animal. Se sabe que en el líquido ascítico en el que crecen las células AS-30D las concentraciones de glucosa son fluctuantes, llegando a valores micromolares, por lo que ambas vías (síntesis y degradación) del metabolismo del glucógeno requieren estar activas para poder almacenar carbohidratos cuando estos se presenten en el torrente y degradarlos cuando no.

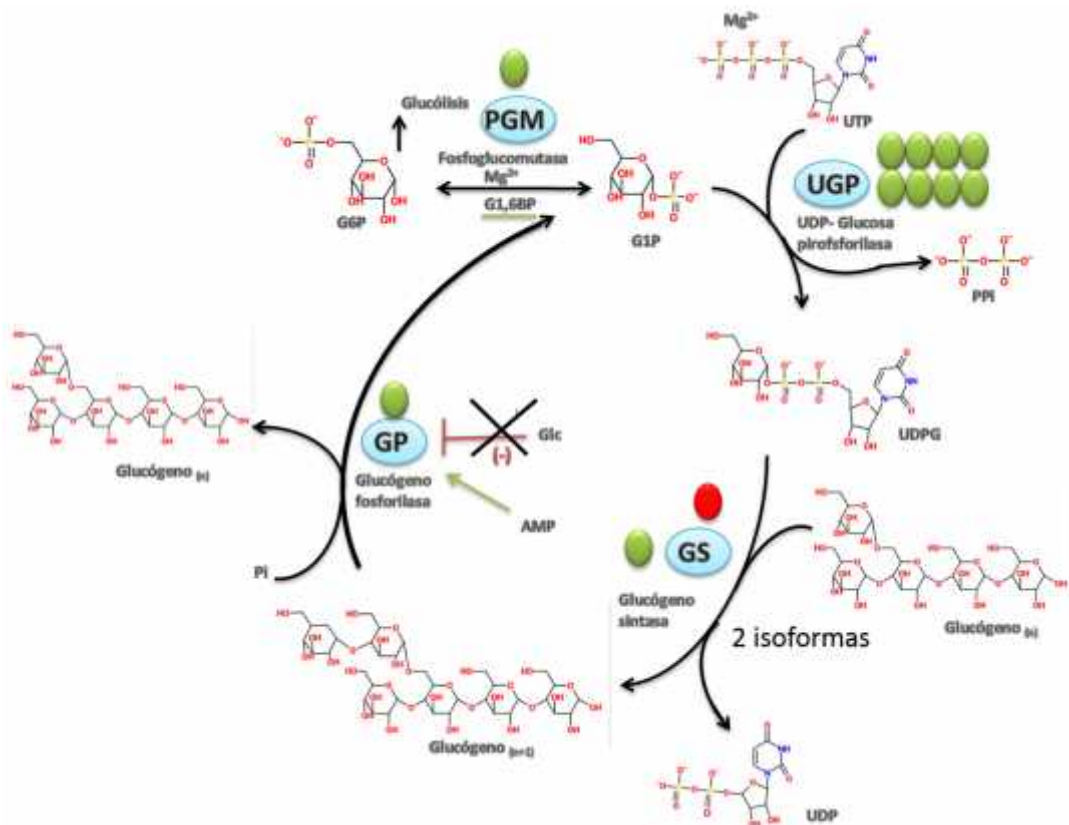
La glucógeno sintasa tumoral se presenta en dos isoformas de alta afinidad y poca velocidad, que implica una baja eficiencia catalítica. Esta es entonces, la enzima limitante de la síntesis glucogenogénica. Por otro lado, la actividad de la GS del hepatocarcinoma no se ve modificada ante la condición de estrés nutricional, lo que manifiesta un posible cambio en su proceso de regulación metabólico y/u hormonal. Esto correlaciona con estudios en los que procesos inflamatorios y de diabetes llevan a las citosinas a bloquear los receptores de insulina provocando que las células expresen

isoformas musculares de la GP y GS para poder continuar con su función metabólica independientemente de la condición nutricional o el control hormonal.

## 7. Conclusiones

Las células tumorales expresan dos isoformas de la GS de alta afinidad con valores distintos de  $K_m$  y  $V_m$ .

Las células tumorales expresan isoformas de la Glucógeno fosforilasa y la Glucógeno Sintasa independientes al control metabólico y hormonal presentes en condiciones de estrés nutricional, lo que se traduce en una mayor eficiencia catalítica en los puntos de control en la síntesis y degradación del glucógeno. (Figura7.1)



## 8. Apéndice

### Ecuación de Michaelis-Menten y gráfico de Lineweaver-Burk

La ecuación de Michaelis-Menten describe el comportamiento de una gran gama de enzimas respecto a su comportamiento cinético en el que se muestra la correspondencia de velocidad enzimática con respecto a la concentración de sustrato y la posterior saturación de esta (velocidad constante).

La ecuación de M-M (Michaelis-Menten) considera a la  $v$  (velocidad) como una función dependiente de la concentración de sustrato, en donde la  $V_m$  (velocidad máxima) y la  $K_m$  (Afinidad de la enzima por su sustrato) son valores constantes.

$$v = V \frac{[S]}{K + [S]}$$

Donde:

$v$  = velocidad (nmol/min\*mg)

$V_m$  = Velocidad máxima (nmol/min+mg)

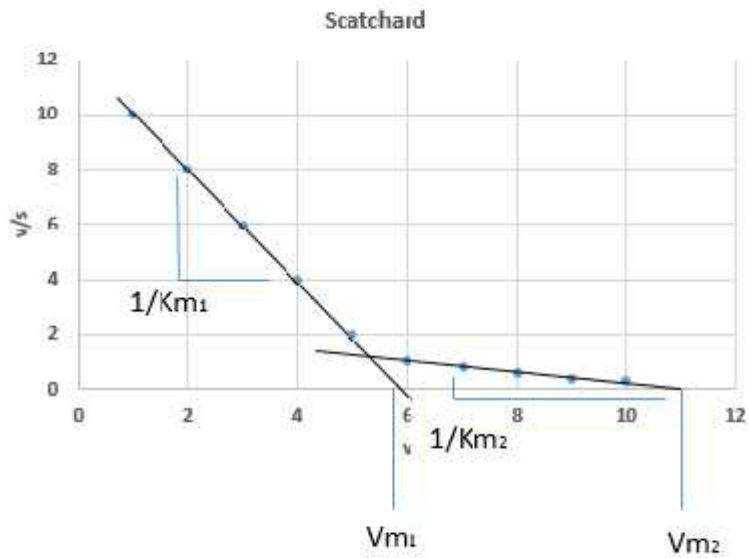
$K_m$  = Afinidad enzima-sustrato (mM)

Al dividir la ecuación anterior entre  $(s)$ , tenemos:

$$\frac{v}{s} = \frac{V}{K + [S]}$$



En esta ecuación, la pendiente corresponde al inverso negativo del valor de  $K_m$  y la intersección con el eje de las abscisas es el valor de la  $V_m$ , así tenemos una gráfica de la siguiente forma:



## Referencias

- P.S. Ward, C.B. Thompson, Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate *Cancer Cell*, 21 (2012), pp. 297–308.
- S.Y. Lunt, M.G. Vander Heiden Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27 (2011), pp. 441–464.
- O. Warburg, On the origin of cancer cells *Science*, 123 (1956), pp. 309–314.
- J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistr*, W.H. Freeman, New York (2002).
- Ebert BL, Gleade JM, O ´Rourke SM, Poulton J., Ratcliffe PJ, Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin, *Biochem J*, 313 (1996) 809-14.
- Fragoso S, Coello P. La AMPK y la homeostasis energética, *REB* 27 (2008) 3-8.
- Huang TC, Chang HY, Hsu CH, Kuo WH, Chang KJ, Juan HF, Targeting herapy for breast carcinoma by ATP synthase inhibitor aurovertin B. *J Proteome Res* 7 (2008) 1433-1444
- Lehninger Nelson, Michael M Cox (2015) *Principios de Bioquímica* 5ta edición, editorial Omega.
- Marín-Hernández A, Gallardo Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, HIF-1alpha modulates energy metabolism in cáncer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Re. Med. Chem.* 9 (2009) 1084-101.
- Marín-Hernández, Gallardo Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Saavedra E (2011) Modeling cáncer glycolysis *Biochim Biophys Acta.* 1807 (2011) 755-67.

- Moreno-Sánchez R, Rodríguez Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E, Energy metabolism in tumor cells, FEBS J. 274 (2007) 1393-1418.
- Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. Oncogene 25 (2006) 4633-4646.
- Trudy Mckee James R Mckee (2003) Bioquímica, la base molecular de la vida. 3ra edición, editorial McGraw Hill. Interamericana.
- Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. Cancer Res. 65 (2005) 2013-21.
- Yun, H; Lee, M; Kin SS. Glucose deprivation increases mRNA Stability of Vascular Endothelial Growth through activation of AMP-activated Protein Kinase in DU145 Prostate Carcinoma, J. Biol. Chem. 280 (2005) 9963-9972.
- Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. Bioquímica. Editorial Reverté. Sexta edición.
- Michael Baumann, Mechthild Krause, Daniel Zips, Cordula Petersen, Klaus Dittmann, Wolfgang Dörr, Hans-Peter Rodemann, Molecular targeting in radiotherapy of lung cancer, Trends in Diagnosis and Therapy of Lung Cancer ( 2004)S187-S197
- Pitcher J, Smythe C, Campbell DG, Cohen P (1987) Identification of the 38-kDa subunit of rabbit skeletal muscle glycogen synthase as glycogenin. Eur J Biochem 169:497–502
- Roach PJ (2002) Glycogen and its metabolism. Curr Mol Med 2: 101–20
- Zeqiraj E, Sicheri F (2015) Getting a handle on glycogen syn- thase—its interaction with glycogenin. Mol Aspects Med 46:63–9

- Agius L (2010) Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 10: 1175–87
- Loughlin WA (2010) Recent advances in the allosteric inhibition of glycogen phosphorylase. *Mini Rev Med Chem* 10:1139–55
- Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernandez-Novell JM, Garcia-Rocha M, de la Iglesia N et al (2003) Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 546:127–32
- Gomis RR, Favre C, Garcia-Rocha M, Fernandez-Novell JM, Ferrer JC, Guinovart JJ (2003) Glucose 6-phosphate produced by gluconeogenesis and by glucokinase is equally effective in activating hepatic glycogen synthase. *J Biol Chem* 278:9740–6
- Baskaran S, Roach PJ, DePaoli-Roach AA, Hurley TD (2010) Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:17563–8
- Lawrence JC Jr, Roach PJ (1997) New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes* 46:541–7
- Halse R, Bonavaud SM, Armstrong JL, McCormack JG, Yeaman SJ (2001) Control of glycogen synthesis by glucose, glycogen, and insulin in cultured human muscle cells. *Diabetes* 50:720–6
- Gaboriaud-Kolar N, Skaltsounis AL (2013) Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2008–2012). *Expert Opin Ther Pat* 23:1017–32
- Agius L (2007) New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21:587–605
- Agius L (2015) Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Mol Aspects Med* 46: 34–45

- Schulze A, Harris AL (2012) How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 491:364–73
- Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B et al (2010) Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* 9: 3506–14
- Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE, Chiavarina B, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Tsirigos A et al (2010) Understanding the “lethal” drivers of tumor-stroma co-evolution: emerging role(s) for hypoxia, oxidative stress and autophagy/mitophagy in the tumor micro-environment. *Cancer Biol Ther* 10:537–42
- Eguchi M, Sugita K, Sugiyama S, Furukawa T (1982) Electron microscopic detection of periodate reactive complex carbohydrates in human T and B lymphocytes. *Scand J Haematol* 29:97–104
- Rousset M, Zweibaum A, Fogh J (1981) Presence of glycogen and growth-related variations in 58 cultured human tumor cell lines of various tissue origins. *Cancer Res* 41:1165–70
- Rousset M, Chevalier G, Rousset JP, Dussaulx E, Zweibaum A (1979) Presence and cell growth-related variations of glycogen in human colorectal adenocarcinoma cell lines in culture. *Cancer Res* 39:531–4
- Rousset M, Chevalier G, Rousset JP, Robine-Leon S, Dussaulx E, Zweibaum A (1979) Kinetics of glycogen levels in asynchronous and synchronous cultures of a human colon carcinoma cell line, HT 29. *Front Gastrointest Res* 4:73–9
- Rousset M, Robine-Leon S, Dussaulx E, Chevalier G, Zweibaum A (1979) Glycogen storage in foetal and

malignant epithelial cells of the human colon. *Front Gastrointest Res* 4:80–5

- Staedel C, Beck JP (1978) Resurgence of glycogen synthesis and storage capacity in cultured hepatoma cells. *Cell Differ* 7:61–71
- Sato A, Kawasaki T, Kashiwaba M, Ishida K, Nagashima Y, Moritani S et al (2015) Glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast showing carcinomatous lymphangiosis and extremely aggressive clinical behavior. *Pathol Int* 65(12):674–6
- Wang DQ, Fiske LM, Carreras CT, Weinstein DA (2011) Natural history of hepatocellular adenoma formation in glycogen storage disease type I. *J Pediatr* 159:442–6
- Favaro E, Bensaad K, Chong MG, Tennant DA, Ferguson DJ, Snell C et al (2012) Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. *Cell Metab* 16:751–64
- Zois CE, Favaro E, Harris AL (2014) Glycogen metabolism in cancer. *Biochem Pharmacol* 92:3–11
- Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouyssegur J, Mazure NM (2012) Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival. *Front Oncol* 2:18
- Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S et al (2010) Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One* 5:e9644
- Iida Y, Aoki K, Asakura T, Ueda K, Yanaihara N, Takakura S et al (2012) Hypoxia promotes glycogen synthesis and accumulation in human ovarian clear cell carcinoma. *Int J Oncol* 40:2122–30

- Philips KB, Kurtoglu M, Leung HJ, Liu H, Gao N, Lehrman MA et al (2014) Increased sensitivity to glucose starvation correlates with downregulation of glycogen phosphorylase isoform PYGB in tumor cell lines resistant to 2-deoxy-D-glucose. *Cancer Chemother Pharmacol* 73:349–61
- Guin S, Ru Y, Agarwal N, Ritterson Lew C, Owens C, Comi GP, et al. Loss of glycogen debranching enzyme AGL drives bladder tumor growth via induction of hyaluronic acid synthesis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015.
- Chen J, Lee HJ, Wu X, Huo L, Kim SJ, Xu L et al (2015) Gain of glucose-independent growth upon metastasis of breast cancer cells to the brain. *Cancer Res* 75:554–65
- Steinberg P, Storkel S, Oesch F, Thoenes W (1992) Carbohydrate metabolism in human renal clear cell carcinomas. *Lab Invest* 67:506–11
- Valera VA, Merino MJ (2011) Misdiagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Nat Rev Urol* 8:321–33
- Kaelin WG Jr (2009) Treatment of kidney cancer: insights provided by the VHL tumor-suppressor protein. *Cancer* 115:2262–72
- Souza Ade A, da Silva GS, Velez BS, Santoro AB, Montero-Lomeli M (2010) Glycogen synthesis in brain and astrocytes is inhibited by chronic lithium treatment. *Neurosci Lett* 482:128–32
- Rodriguez-Gil JE, Fernandez-Novell JM, Barbera A, Guinovart JJ (2000) Lithium's effects on rat liver glucose metabolism in vivo. *Arch Biochem Biophys* 375:377–84
- Haugaard ES, Mickel RA, Haugaard N (1974) Actions of lithium ions and insulin on glucose utilization, glycogen synthesis and glycogen synthase in the isolated rat diaphragm. *Biochem Pharmacol* 23:1675–85

- Souza DN, Mendes FM, Nogueira FN, Simoes A, Nicolau J. Lithium induces glycogen accumulation in salivary glands of the rat. *Biological trace element research*. 2015.
- de Luna N, Brull A, Guiu JM, Lucia A, Martin MA, Arenas J et al (2015) Sodium valproate increases the brain isoform of glycogen phosphorylase: looking for a compensation mechanism in McArdle disease using a mouse primary skeletal-muscle culture in vitro. *Dis Model Mech* 8:467–72