

### Sobre expresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas

#### *Overexpression of genes of glycolytic pathway enzymes in cancer cells*

Gustavo F. Gonzales Rengifo<sup>1</sup>, Cynthia Gonzales Castañeda<sup>2</sup>, Diego Espinosa Guerinoni<sup>2</sup>, Cristina Rojas Tubeht<sup>2</sup>.

#### RESUMEN

El cáncer es una importante causa de mortalidad a nivel mundial y el número de personas que se ven afectadas por esta condición va en aumento. Se sabe que las células cancerígenas tienen una mayor actividad de la vía glicolítica respecto a las células normales, y esto se debe a una sobre expresión de los genes que codifican las enzimas que intervienen en esta ruta metabólica. Se ha visto que este metabolismo aberrante permite a las células cancerígenas cumplir su objetivo: proliferar velozmente y a su vez tener una fuente constante de energía. De esta manera se tiene una ventaja significativa con respecto a las células de los tejidos sanos. A pesar de que es ampliamente aceptada la importancia funcional de la glicólisis en el cáncer poco se conoce acerca de la influencia de la expresión genética en las elevadas tasas de esta ruta metabólica. En esta revisión se trata de recopilar los datos que sustenten el hecho de que existe una sobre expresión de los genes que codifican las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas, determinar cuáles son estas enzimas y describir algunas de las técnicas empleadas en el estudio de la sobre expresión génica.

**Palabras clave:** glicólisis, cáncer, oncogenes, HIF-1, c-MYC

#### ABSTRACT

*Cancer is an important cause of mortality worldwide and the number of people who are affected by it is increasing. It is known that cancer cells have greater glycolytic activity compared to normal cells. This is due to overexpression of genes which codify enzymes involved in this metabolic pathway. This aberrant metabolism allows cancer cells to proliferate quickly while using a constant source of energy. Through this, cancer cells have a significant advantage over normal tissue cells. The functional importance of glycolysis in cancer is widely accepted, but little is known about the influence of gene expression of this metabolic pathway working at high rates. In this review we compile information on the overexpression of genes codifying glycolytic pathway enzymes in cancer cells, determine which are the enzymes involved and describe some of the techniques applied in the study of gene overexpression.*

**Key words:** glycolysis, cancer, oncogenes, HIF-1, c-MYC

#### INTRODUCCIÓN

Las células cancerígenas tienen una proliferación celular anormal debido a defectos en sus circuitos de regulación<sup>1</sup>. Existen más de 100 tipos distintos de cáncer, y varios subtipos de tumores que se pueden encontrar dentro de órganos específicos<sup>2</sup>. Una característica común que ha sido observada en las células cancerígenas malignas y pobremente diferenciadas es su capacidad de metabolizar glucosa a grandes velocidades<sup>3</sup>, hecho demostrado desde hace décadas basada en la observación de que los tumores presentan altas tasas de captación de glucosa y de glicólisis<sup>4</sup>. A pesar que estos cambios metabólicos no son los defectos fundamentales que causan el cáncer, ellos pueden conferir cierta ventaja en diferentes tipos de cáncer, lo que permite a la célula poder sobrevivir e invadir. Es así que los estudios recientes se ha enfocado en demostrar que varias de las alteraciones genéticas que causan el desarrollo de tumores afectan directamente a la glicólisis y a la respuesta celular a hipoxia<sup>5</sup>.

Este metabolismo aberrante que presentan las células cancerígenas sirve a la célula para poder proliferar manteniendo un suplemento constante de energía. Son varios estudios donde se observan que los tumores malignos tienen la capacidad de metabolizar la glucosa a lactato en velocidades mucho mayores que las células normales<sup>1,2,4,6,7</sup>.

La glicólisis es generalmente estudiada en un tipo de cáncer, sin embargo ya se han detectado una sobre expresión génica en 24 tipos distintos de cáncer<sup>5</sup>.

Comprender el mecanismo que desarrollan las células cancerígenas para obtener energía y así lograr su veloz proliferación; conocer nuevos rasgos celulares que caractericen a los tejidos cancerígenos y; aplicar los conceptos adquiridos en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y así lograr tratamientos más efectivos son algunas de las razones que justifican el desarrollo de la siguiente revisión.

Finalmente, el objetivo que persigue este análisis es la de recopilar datos que sustenten el hecho de que existe una sobreexpresión de los genes que codifican las enzimas de la vía glicolítica en las células cancerígenas.

1. Médico Endocrinólogo, Instituto de Investigaciones de la Altura y Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.  
2. Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia

A su vez, esperamos poder determinar cuáles son estas enzimas de la vía glicolítica; profundizar en el estudio de la glicólisis en tejidos normales y cancerígenos y finalmente describir algunas de las técnicas que se emplean en el estudio de la sobre expresión genética.

### Glicólisis y enzimas involucradas

La obtención de energía a través de la glicólisis es un mecanismo usado tanto por células normales como por células cancerígenas. El aumento de la glicólisis puede ser considerado como una adaptación o respuesta por parte de la célula cuando hay una mayor demanda de energía<sup>8</sup>. Dado que la glicólisis genera ATP, se considera como un mecanismo compensatorio cuando la fosforilación oxidativa es ineficiente, como sucede en el cáncer<sup>9</sup>.

Para entender el motivo y los mecanismos de la elevada tasa glicolítica en células cancerígenas, explicaremos primero como se realiza la glicólisis en una célula normal.

Todas las células de los mamíferos metabolizan la glucosa a piruvato por vía de la glicólisis<sup>10</sup>. Este es un sustrato único, ya que la glicólisis se puede dar tanto en ausencia de oxígeno, donde se produce lactato, como en presencia de este donde se puede metabolizar el piruvato a acetil-CoA y pasar a su oxidación completa a CO<sub>2</sub> y agua, produciendo una gran cantidad de energía en la fosforilación oxidativa<sup>11</sup>.

En la glicólisis se degrada una molécula de glucosa (compuesta por 6 carbonos) hasta dos moléculas de piruvato (compuesta por 3 carbonos). Este proceso se da a través de 10 reacciones, catalizadas por 10 enzimas diferentes<sup>12</sup>. Ver Figura 1.

Durante las reacciones, parte de la energía libre cedida por la glucosa es conservada en forma de ATP y NADH. De esta forma se producen 4 ATP y se gastan 2 ATP durante la glicólisis, lo que da una ganancia neta de 2 ATP<sup>12</sup>.

A continuación se muestra la vía completa de la glicólisis:

Los primeros cinco pasos de la glicólisis son denominados fase preparatoria ya que se invierten dos moléculas de ATP, elevando el contenido de energía libre de los intermediarios y convirtiendo las hexosas a un producto común que es el gliceraldehido-3-fosfato<sup>12</sup>. En esta fase participan las siguientes enzimas: hexoquinasa, fosfohexosa isomerasa, fosfofruc-toquinasa-1, aldolasa, y triosa fosfato isomerasa<sup>2</sup>.

Los últimos cinco pasos son denominados fase de beneficio donde la energía es conservada en los enlaces del ATP; el rendimiento neto es de dos moléculas de ATP. Las moléculas de ATP también permiten conservar energía<sup>12</sup>. En esta fase participan las siguientes enzimas: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa<sup>2</sup>.

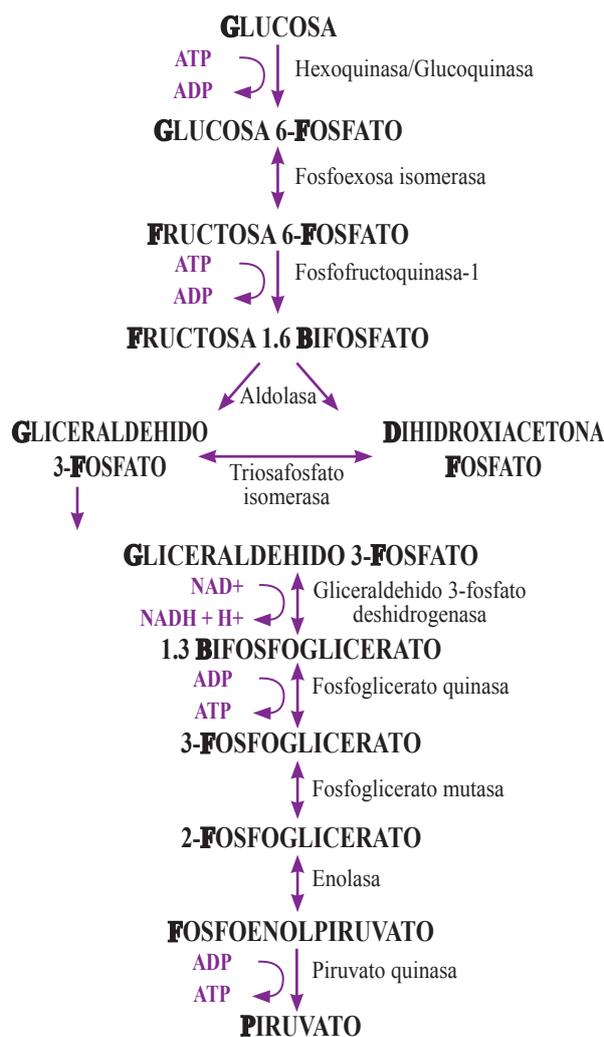


Figura 1. Glicólisis: consta de 10 reacciones realizadas por 10 enzimas distintas

Durante la glicólisis se realizan tres tipos de transformaciones químicas: (a) Degradación del esqueleto carbonado de la glucosa (con la obtención final de piruvato), (b) Fosforilación del ADP a ATP por compuestos de fosfato de alta energía, y (c) Transferencia de átomos de un ion H<sup>+</sup> con sus electrones hacia el NAD<sup>+</sup>, convirtiéndolo en NADH<sup>12</sup>.

Luego de que la glucosa es degradada a dos moléculas de piruvato, este puede seguir dos vías distintas en células animales<sup>13</sup>. En condiciones anaeróbicas el piruvato se convierte a dos moléculas de lactato (fermentación láctica que se realiza en el músculo), y en condiciones aeróbicas el piruvato se convierte a dos moléculas de acetil-CoA que luego ingresa al ciclo del ácido cítrico (realizado en la mitocondria) y se degrada a CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O. Siguiendo esta vía, donde el aceptor final es el oxígeno, se obtendrán 30 ó 32 ATP, los cuales serán usados por la célula como fuente de energía para las funciones normales de la célula, como la proliferación, el crecimiento y metabolismo<sup>10</sup> (Figuras 2 y 3).

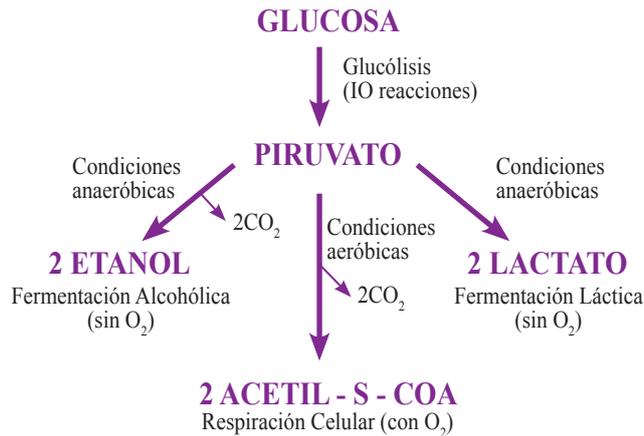


Figura 2. Rutas del piruvato: en células animales el piruvato puede pasar a lactato o a acetil CoA

El paso de piruvato a lactato es un punto crítico en lo que se refiere al metabolismo del cáncer. La enzima que cataliza esta reacción (Piruvato  $\rightarrow$  Lactato) es la lactato deshidrogenasa (LDH). Se ha demostrado cambios en la expresión de esta enzima en células tumorales. Como consecuencia se observan cambios en la fisiología mitocondrial. Esto fue comprobado por un estudio experimental<sup>14</sup> en el que se observó que en células tumorales deficientes de LDH hubo un aumento de la respiración mitocondrial.

Es importante mencionar que también existen otros mecanismos (aparte de la sobre expresión de enzimas) para que las células cancerígenas logren una elevada tasa glicolítica. Se ha demostrado que la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT-1) varía en células humanas procedentes de tejidos cancerígenos<sup>15</sup>. En el estudio citado se comprobó que aumentaba la expresión de GLUT-1 en el cáncer de mamas y que esta sobre expresión hacía que aumente la tasa de glicólisis.

Tomando en cuenta la principal característica de los tejidos cancerígenos es una elevada proliferación celular, podemos inferir que la alta tasa de glicólisis es uno de los mecanismos usados para lograrlo.

### El cáncer y la glicólisis en células cancerígenas

La iniciación del cáncer se da cuando una célula no puede controlar sus procesos de división y muerte celular y por lo tanto se produce una proliferación descontrolada. Esto lleva a numerosas lesiones genéticas y epigenéticas<sup>16</sup>. Todas las células están involucradas con mecanismos de regulación del potencial de proliferación y diferenciación así como de la apoptosis<sup>1</sup>. Las dos primeras son importantes para la formación, reparación y mantenimiento de una buena función de todos los tejidos y órganos del organismo. Cuando se llega a un tamaño adecuado, las células de los tejidos dejan de proliferar y diferenciarse<sup>17</sup>.

Por lo tanto las células cancerígenas tienen dos características distintivas: (a) Se reproducen a pesar de los mecanismos de control normales, es decir, presentan un alto nivel de proliferación celular. (b) Invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células. De esta forma se dan alteraciones en la morfología y fisiología, lo que produce una serie de patologías altamente dañinas para el ser humano.

Hace varias décadas, salió a luz la idea que el cáncer podría deberse a una disminución del metabolismo energético mitocondrial paralelo con un aumento en el flujo glicolítico<sup>4</sup>. Existe evidencia que sugiere que hay una relación cercana entre los cambios metabólicos y genéticos observados durante el crecimiento proliferativo<sup>6</sup>. Warburg postuló que la mayoría de tumores mostraba una alta velocidad glicolítica bajo condiciones aeróbicas<sup>2</sup>.

Las células normales utilizan el oxígeno para la producción de ATP por fosforilación oxidativa<sup>18</sup>. Cuando son privados de oxígeno, el piruvato no es metabolizado a través del ciclo de Krebs, sino que es convertido a lactato para completar los NAD y generar energía<sup>2</sup>. Durante el crecimiento tumoral, la producción de lactato a partir de glucosa se da aún en presencia de oxígeno, por lo que fue denominada como glicólisis aeróbica<sup>11</sup>, junto a un aumento de la velocidad de transporte de glucosa<sup>18</sup>.

Los tumores, a diferencia de los tejidos normales, existen en ambientes ácidos que resultan de la producción de lactato y otros ácidos<sup>2</sup>. El pH citosólico de células tumorales, sin embargo, es mantenido como en las células normales<sup>19</sup>.

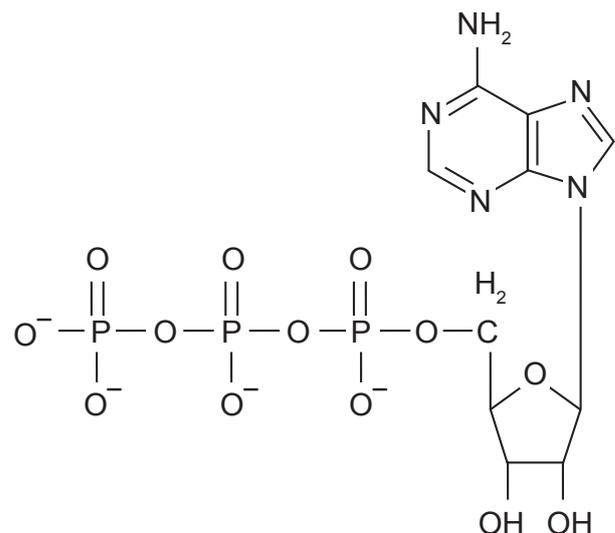
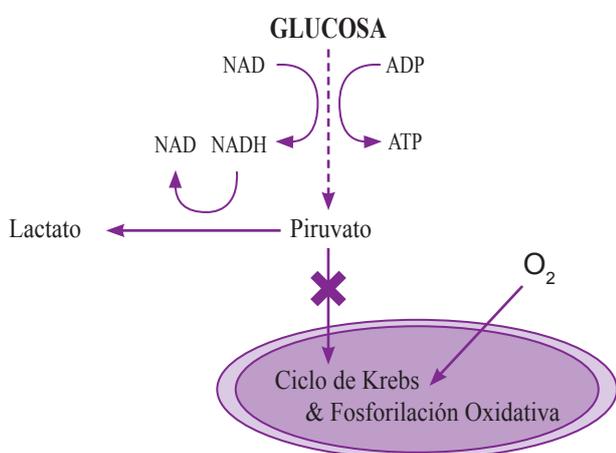


Figura 3. La energía de la degradación de glucosa es guardada en los enlaces fosfato de alta energía del ATP.

Aunque Warburg sugirió que el aumento de la glicólisis podría ser la principal causa del crecimiento tumoral, se ha visto que la eficiencia de la conversión energética mitocondrial podría ser el factor metabólico clave<sup>7</sup>, ya que el cáncer resulta de un metabolismo mitocondrial alterado<sup>11</sup>. Una gran variedad de cánceres muestran los siguientes patrones: delección del ADN mitocondrial, contenido mitocondrial reducido, morfología mitocondrial alterada, capacidad oxidativa dañada<sup>20,21</sup> y un aumento en la tasa glicolítica y de producción de lactato<sup>4</sup>. Este metabolismo mitocondrial alterado junto a la disminución de la actividad del ciclo de Krebs puede estar favoreciendo el crecimiento de este tipo de células<sup>7</sup>. Además, se ha observado que la frecuencia de mutaciones en el ADN mitocondrial es diez veces mayor que en el ADN nuclear<sup>22</sup>. En la Figura 4 se observa la utilización de la glucosa a través de la vía glicolítica y su producción hacia lactato en condiciones aeróbicas en células cancerígenas.



**Figura 4.** Utilización de glucosa en la vía glicolítica y ciclo de Krebs.

Se ha visto que el potenciamiento de la glicólisis es posible mediante diversos mecanismos como es la amplificación de genes, el aumento de su expresión, aumento de la translación, modificaciones postranslacionales y regulaciones por interacciones proteína-proteína en el citoplasma<sup>5</sup>.

De esta manera, la habilidad de mantener una velocidad incrementada de utilización de glucosa y la capacidad para sostener grandes velocidades de glicólisis bajo condiciones aeróbicas son los fenotipos bioquímicos más comunes de rápido crecimiento de células cancerígenas<sup>23</sup>. Esta elevada velocidad de catabolismo de glucosa es importante para tumores malignos, que obtienen el 50% de su energía y los precursores anabólicos para las vías biosintéticas mediante la glicólisis<sup>24</sup>.

La regulación del metabolismo glicolítico ocurre bajo una gran cantidad de vías oncogénicas y se ha visto relacionada con un aumento de agresividad del tumor<sup>16</sup>.

Esta observación sugiere que el fenotipo glicolítico juega un rol en la progresión del tumor por contribución al crecimiento o supervivencia del tumor.

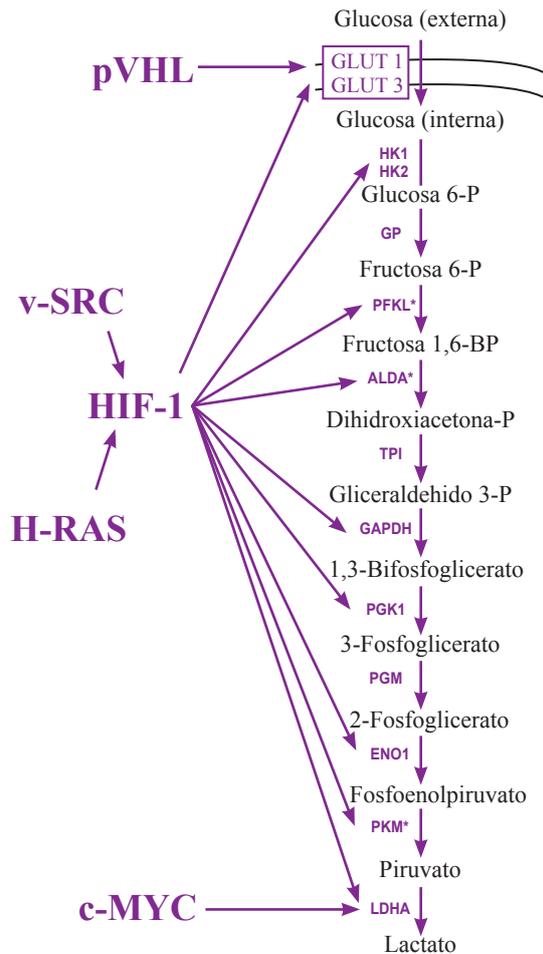
A pesar que el efecto Warburg es una de las características más universales de tumores, la base molecular de este fenómeno ha sido recientemente aclarada mediante estudios<sup>25-28</sup> que indican que el incremento de la tasa glicolítica se debería al aumento en la expresión de los genes que codifican las enzimas de la glicólisis<sup>5</sup>, provocado por la activación de factores de transcripción o oncogenes como c-MYC, USF-1, v-SRC, H-RAS o el factor inductor de hipoxia (HIF-1 $\alpha$ )<sup>18</sup>.

La glucosa es el principal regulador de la transcripción de genes que codifican a las enzimas de la vía glicolítica, que se da mediante la estimulación de su transcripción a través del elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE), cuya secuencia es 5'-CACGTC-3'. ChoRE sirve para poder integrar señales fisiológicas mediante factores de transcripción para regular el metabolismo de glucosa<sup>18</sup>.

En la Figura 5 se observa el transporte de glucosa a través de la membrana celular por los transportadores de glucosa (GLUT-1 y GLUT-3) y el catabolismo subsiguiente de glucosa por la vía glicolítica. Se muestran los diversos puntos de regulación por el supresor de tumores p53 y von Hippel-Lindau (pVHL), así como la oncoproteína c-MYC y el factor de transcripción inductor de hipoxia 1 (HIF-1)<sup>2</sup>. Los asteriscos presentes en las diferentes enzimas indican que estas contienen elementos de respuesta a carbohidratos (ChoRE).

Las medidas de tensión de oxígeno en tumores humanos revelan una hipoxia significativa<sup>2</sup>. El ambiente hostil selecciona a las células que están adaptadas a hipoxia crónica. En células normales, una respuesta crítica a hipoxia es la inducción a factor de transcripción inductor de hipoxia, HIF-1, que promueve la transcripción de genes asociados al metabolismo<sup>29</sup>. Este se une a la secuencia de ADN e incrementa la expresión de genes que codifica a las enzimas glicolíticas y de esta manera promueve la adaptación celular para reducir la disponibilidad de oxígeno mediante el aumento de la ingesta de glucosa y el aumento de la glicólisis<sup>30</sup>.

Lo que produce la hipoxia en células cancerígenas es inducir fisiológicamente la expresión de genes de la vía glicolítica mediante los sitios de unión a HIF-1<sup>18</sup>. De esta manera, HIF-1 se une a los genes cuyos sitios de unión tengan la secuencia central 5'-RCGTG-3'<sup>25</sup> para de esta manera poder promover la adaptación celular necesaria para poder disminuir la disponibilidad de oxígeno mediante un aumento de la glucosa y glicólisis<sup>29</sup>. Esto se va a lograr mediante un aumento de la expresión de genes que codifican las enzimas glicolíticas como la aldolasa A, la enolasa 1, la lactato deshidrogenada A, la fosfofructoquinasa L, fosfoglicerato quinasa 1, y piruvato quinasa M, así como el gen del factor de crecimiento



vascular endotelial (VEGF)<sup>2</sup> y el transportador de glucosa, GLUT-1<sup>31</sup>. Sin embargo, no solo es necesario del sitio de unión sino que también se necesita que HIF-1 interactúe con otros factores de transcripción unidos a sitios adyacentes<sup>25-28</sup>. Como resultado de las alteraciones genéticas y la hipoxia intratumoral, el HIF-1 es sobreexpresado en la mayoría de los cánceres humanos comunes<sup>25-28</sup>.

Las células proliferativas expresan al VEGF que va a estimular la angiogénesis para dar una mayor perfusión y mantener de esa manera la oxigenación<sup>28</sup>, la cual es regulada negativamente por c-MYC<sup>18</sup>.

Además de las alteraciones en la tensión de oxígeno, los cambios en las concentraciones de glucosa también activan varios genes de las enzimas glicolíticas a través del elemento de respuesta a carbohidratos, el cual encaja a los sitios de unión en la secuencia para MYC y HIF-1<sup>32</sup>, 5'-RCGTG-3', que sirven para activar la transcripción<sup>18</sup>. La activación de las vías de HIF-1 pueden mediar las respuestas adaptativas a hipoxia e hipoglicemia en células cancerígenas. Alternativamente, la activación de oncogenes o la pérdida de los supresores de tumores por mutaciones somáticas, pueden llevar directamente a alteraciones no fisiológicas del metabolismo celular y proveer una ventaja selectiva en ambientes metabólicos hostiles<sup>2</sup>.

El oncogene c-MYC se encuentra activado en una variedad de vías importantes para el control del crecimiento celular y tumorigénesis<sup>18</sup> y codifica a un factor de transcripción que lo que hace es heterodimerizar a otro oncogene (MAX) para que se pueda unir a la secuencia 5'-CACGTG-3'<sup>2</sup>. De esta manera c-MYC estimula la captura de glucosa y también al metabolismo así como va a activar la maquinaria del ciclo celular necesaria para la proliferación celular<sup>18</sup>. La expresión de c-MYC deja a las células susceptibles a la muerte por varios estímulos<sup>33</sup> y es un blanco directo para mutaciones oncogénicas, mientras que la expresión del factor inductor de hipoxia 1 (HIF-1) es regulada indirectamente vía la ganancia de funciones de mutaciones en oncogenes y la pérdida de funciones de mutaciones en genes supresores de tumores<sup>26,27</sup>.

En la Figura 6 se puede observar los sitios de unión del factor de transcripción dentro del promotor proximal del gen que codifica la enzima lactato deshidrogenasa A (LDH-A). La caja E (5'-CACGTG-3') es el centro de consenso del elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE) y se une con los sitios de unión para la transcripción del HIF-1, MYC-MAX y USF. MYC y HIF-1 pueden unirse a los elementos cis directamente, mientras que v-SRC y H-RAS activado potencian la actividad de HIF-1 y otros factores que se unen a estos elementos y activan la glicólisis.

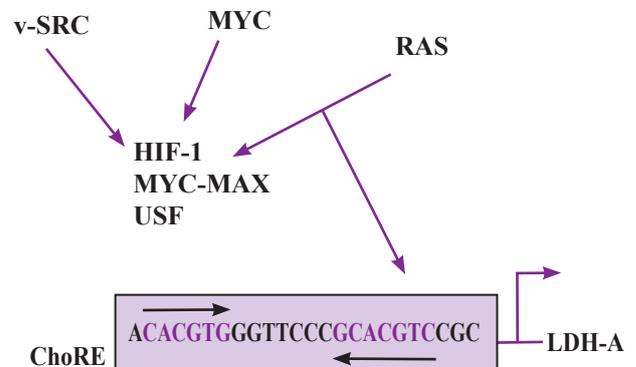


Figura 6. Sitios de unión del factor de transcripción dentro del promotor proximal del gen que codifica a la enzima lactato deshidrogenasa A (LDH-A).

Para el crecimiento de tumores en condiciones hipóxicas, se necesita de un alto flujo glucolítico, y según lo observado, muchas de las células transformadas muestran esta alta tasa de glicólisis<sup>29</sup>. Este flujo es controlado principalmente por la 6-fosfofructo-2-quinasa, siendo la fructosa-2,6-bifosfato (Fru-2,6-P2) el activador alostérico más poderoso<sup>34</sup>, y de esta manera se obtiene un control de la vía glicolítica. La 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa es una enzima bifuncional cuya función es catalizar la síntesis y degradación de Fru-2,6-P2 y de esa manera regular el metabolismo de carbohidratos<sup>35</sup>.

Se han visto cuatro genes implicados en la codificación de las diferentes isoformas de la familia de la 6-fosfofructo-2-quinasa, la PKFB 1-4<sup>29</sup>. Estas isoformas muestran diferencias en la distribución de sus tejidos y además tienen propiedades cinéticas en respuesta a las señales efectores alostéricas, hormonales y de factor de crecimiento<sup>36</sup>. El gen PKFB 3 se encuentra ubicado en diversos lugares y es expresada continuamente en tejidos proliferativos<sup>37,38</sup>, en líneas celulares transformadas<sup>39</sup>, y en varios tumores<sup>40</sup>. El producto de este gen tiene el cociente de la actividad quinasa/ fosfatasa bien alta<sup>41</sup> con lo que indica que en los tejidos donde va a ser expresada, se mantendrán los niveles de fructosa-2,6-bifosfato y las altas tasas de glicólisis serán sostenidas<sup>29</sup>.

La principal consecuencia de una elevada tasa de glicólisis en células tumorales es que los carbonos de glucosa son convertidos principalmente a lactato<sup>3</sup> a altas velocidades mayores que en células normales<sup>2</sup>, por lo tanto dejan de ser la principal fuente de carbonos para la respiración aeróbica. En las células tumorales que son capaces de consumir cantidades limitadas de oxígeno, la glutamina es el principal sustrato oxidable que entra a un ciclo de Krebs truncado<sup>2</sup>. El aumento en esta velocidad en el transporte de glucosa, depende de los niveles elevados de la enzima hexoquinasa<sup>42</sup>. Esta enzima participa en el primer paso de la vía glicolítica donde convierte la glucosa a glucosa 6-fosfato, el cual es el intermediario fosforilado inicial de la vía glicolítica<sup>2</sup>.

La glicólisis en algunos tipos de células de mamíferos se ha reportado que lo controlan la hexokinasa (HK) y la fosfofructokinasa-I (PFK-I) entre un 70 % y un 30%, respectivamente<sup>43</sup>. La enzima hexokinasa ha atraído la atención debido a que está involucrada en la iniciación y mantenimiento de altas tasas de catabolismo de glucosa en tumores con rápido crecimiento<sup>44</sup>, y porque se ha visto que el gen que codifica esta enzima (del tipo II), se encuentra amplificada en líneas celulares de hepatoma y como consecuencia se encuentra marcadamente elevada en los tumores<sup>45</sup>. El rol de la hexokinasa ha sido tema de gran investigación para poder entender la base molecular de su fenotipo glicolítico aberrante, y ha sido considerado como un blanco potencial para el arresto del crecimiento celular de tumores. Se ha logrado observar que en comparación con células normales, la actividad de la hexokinasa es marcadamente elevada en la glicólisis en tumores en avanzado crecimiento<sup>24</sup>, y que en células deficientes del HIF-1  $\alpha$ , la expresión de la hexoquinasa II se encuentra marcadamente disminuida<sup>46</sup>.

En las células tumorales AS-30D (de rata) se determina que este porcentaje cambia, de tal forma que la HK junto con el transportador de glucosa controlan 71%, 4 % la PFK-I y 25% el bloque de enzimas conformado por la aldolasa, TIM, GAPDH, PGK, PGM, ENO, PYK, LDH y la demanda de ATP<sup>43</sup>. La redistribución

del control en las células tumorales AS-30D se origina aparentemente debido al aumento en la actividad de todas las enzimas de la glucólisis (con respecto a hepatocito), pero específicamente de la hexokinasa y la fosfofructokinasa-I<sup>45</sup>, que son las enzimas que incrementan en mayor proporción su actividad (124 y 22 veces respectivamente), lo que ocasiona un aumento en las concentraciones de sus productos, la glucosa 6-fosfato y la fructosa 1,6-bifosfato en 5 y 250 veces respectivamente, trayendo como consecuencia un incremento en la velocidad de glicólisis de 20 veces<sup>43</sup>.

Los altos niveles de glicólisis no solo proveen de ATP para la gran demanda bioenergética de las células tumorales, sino que también provee de precursores y reduce a los equivalentes para la síntesis de macromoléculas<sup>19</sup>. En varios tejidos, la síntesis de ácidos grasos ocurre a bajas velocidades, ya que los lípidos son adquiridos vía la circulación para proveer las necesidades de las células vegetativas no proliferativas. En contraste, la nueva síntesis de ácidos grasos ocurre a grandes velocidades en tejidos tumorales<sup>47</sup>. En la mayoría de las células tumorales, casi todos los ácidos grasos son derivados de la síntesis de novo a pesar de tener un suplemento abundante de lípidos extracelulares. La gran tasa de síntesis de ácidos grasos en células altamente proliferativas, provee de energía a la biogénesis de la membrana. Es posible que el incremento del metabolismo de la glucosa contribuya a la proliferación de células tumorales por promover a la síntesis de ácidos grasos<sup>48</sup>.

En células que han pasado a una conversión glicolítica (han pasado de un modo de metabolismo oxidativo a uno glicolítico), gran cantidad de la demanda bioenergética es suministrada a través de la producción glicolítica de ATP, y el piruvato entra a un ciclo truncado donde el citrato es exportado preferentemente al citosol vía el transportador tricarbocilato<sup>49</sup>. Una vez en el citosol, el citrato es cortado por la ATP citrato liasa para producir acetil Co-A citosólico y regenerar el oxalacetato. El acetil-CoA es el requisito para la síntesis endógena de ácidos grasos, colesterol e isoprenoides, así como las reacciones de acetilación que modifica a las proteínas<sup>19</sup>.

Para completar este ciclo, el oxalacetato es reducido a malato, el que puede regresar a la mitocondria, reciclando carbono y reduciendo equivalentes en la mitocondria. La conversión de oxalacetato a malato citosólico es dirigido por el alto ratio de NADH/NAD<sup>+</sup> citosólico presente en las células glicolíticas<sup>50</sup>. El malato puede entrar en la matriz mitocondrial y ahí ser convertido a oxalacetato para completar el ciclo. La conversión de NAD<sup>+</sup> a NADH provee un mecanismo continuo para preservar el potencial de la membrana mitocondrial y sostener un gran ratio NADH/NAD<sup>+</sup> mitocondrial que mantenga el ciclo truncado en estado reprimido. Además, la actividad enzimática del ATP-

citrato liasa está equilibrada para afectar tanto a la lipogénesis dependiente de glucosa y a la bioenergética celular<sup>19</sup>.

La ATP-citratoliasa (ACL) es una enzima homotetramérica con una expresión en gran cantidad de tejidos, lo que exhibe una regulación transcripcional coordinada con otras enzimas en la vía lipogénica<sup>48</sup>. Los niveles de ACL aumentan en respuesta a señales que comunican un estado nutricional, activa la liberación y metabolismo de glucosa celular, y estimula un crecimiento anabólico<sup>19</sup>.

Las vías de señalización que contribuyen al fenotipo glicolítico y juegan un papel importante en la tumorigénesis, pueden también llevar a incrementar los niveles y/o actividad de la ACL<sup>48</sup>. Estas vías pueden explicar en parte el hecho que la actividad de la ACL se ha visto significativamente elevada en carcinomas de mamas y vejiga versus tejidos normales de mamas y vejiga<sup>51</sup>.

La conversión de glicólisis aeróbica parece ser capaz de promover el crecimiento tumoral mediante la estimulación de síntesis de lípidos y mediante la supresión de la diferenciación de la célula tumoral. Estas propiedades pueden contribuir a la selección de una conversión a glicólisis anaeróbica durante la progresión de tumores in vivo (el efecto Warburg) y al parecer los inhibidores de ACL pueden tener un rol potencial en suprimir el crecimiento de tumores malignos<sup>19</sup>.

En los últimos años se ha visto que solo se ha estudiado la glicólisis en unos cuantos cánceres<sup>52</sup>, y por lo general se ha visto el estudio de la inducción de la 6-fosfofructo-2-quinasa en líneas celulares de varios cánceres humanos<sup>53</sup>. En la Tabla 1 se puede observar los diversos genes y su expresión en 24 tipos de cáncer. Se ha observado que en cánceres de cerebro, nódulo linfático y próstata existe una sobre expresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica. Sin embargo, los cánceres de colon y glándula mamaria parecen tener otro tipo de mecanismos ya que no aparentan tener una máxima sobre expresión<sup>39</sup>. Aún así, la glicólisis se sigue manteniendo afectada.

Todas las sobre expresiones de genes se observan que ocurren en la glicólisis. No se ha encontrado en ninguna otra vía bioquímica un patrón consistente de la sobre expresión génica, ni siquiera en el ciclo del ácido cítrico la cual también provee de energía a los tejidos cancerígenos<sup>5</sup>.

### Técnicas para evaluar sobre expresión de genes

#### a. Análisis de Northern Blot.

El método de Northern Blot continúa siendo, a pesar del enorme desarrollo de nuevas tecnologías como el PCR en Tiempo Real, la herramienta estándar para el análisis cualitativo y cuantitativo de niveles de ARN mensajero (ARNm) en una determinada célula o tejido de interés.

**Tabla 1. Lista de genes y su expresión en diversas enzimas de la vía glicolítica comparada a la del ciclo de Krebs.**

Vía de glicolisis	Nombre del gen	Descripción	Cáncer
Paso 1 ATP → ADP	HKI	Hexoquinasa I	3
Paso 2	GPI	Glucosa Fosfato Isomerasa	14
Paso 3 ATP → ADP	PFKL	Fosfofructoquinasa Hígado	9
Paso 4	ALDOA	Aldolasa A	18
Paso 5	TPI	Triosafofato Isomerasa I	15
Paso 6 2NAD → 2NADH	GAPD	Gliceraldehido 3-fosfato	21
Paso 7 ADP → ATP	PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1	15
Paso 8	PGAM1	Fosfoglicerato mutasa 1	13
Paso 9 ADP → ATP	ENO	Enolasa 1	20
Paso 10	PKM	Piruvato quinasa	21
			<b>149</b>
<b>Glicólisis anaeróbica y transportador de enzimas</b>			
Lactato	LDHA	Lactato deshidrogenasa A	13
Lactato	LDHB	Lactato deshidrogenasa B	17
Transporte	GLUT1	Transportador de glucosa 1	6
			<b>36</b>
<b>Ciclo de ácido cítrico</b>			
Paso 1 H <sub>2</sub> O ↔ CoA-SH	CS	Citrato sintasa	10
Paso 2 ↔ H <sub>2</sub> O Paso 3 → H <sub>2</sub> O	ACO2	Aconitasa 2	6
Paso 4 CO <sub>2</sub>	IDH2	Isocitrato deshidrogenasa 2	5
Paso 5 CoA-SH → CO <sub>2</sub>	OGDH	Oxoglutarato deshidrogenasa	3
Paso 6 GDP(ADP) → GTP(ATP)	SUCLA2	Succinato-CoA ligasa	0
Paso 7	SDHA	Succinato deshidrogenasa	7
Paso 8	FH	Fumarato hidratasa	4
Paso 9	MDH1	Malato deshidrogenasa 1	6
			<b>45</b>

Esta técnica consiste básicamente en la extracción de ARN total (ARN del tipo mensajero, ribosomal y de transferencia). Posteriormente se separa por tamaño en un gel de agarosa el tipo de ARN que se desee estudiar y se transfiere por adhesión a una membrana de nylon. Finalmente se procede a hibridizar este ARN con una determinada sonda o secuencia de ADN o ARN que contenga a su vez un reportero (un marcador radioactivo por ejemplo) que permita identificar, visualizar e identificar la hibridación de ambos fragmentos de ácidos nucleicos y así determinar la posición y la cantidad de la región de interés<sup>54</sup>.

Las principales desventajas que tiene esta metodología implican:

- Fragilidad del ARN, dado que es muy susceptible a degradarse si no se toman las debidas precauciones tales como el uso de material libre de ARNasas y el almacenamiento a temperaturas adecuadas (-70°C).
- No tiene la sensibilidad con la que cuentan otras técnicas más recientes.
- El desarrollo de sondas de hibridación para más de una región es un proceso complicado.

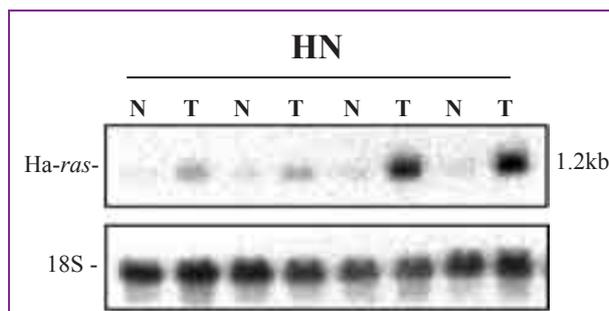
Para el análisis específico de tejidos cancerígenos la metodología implica la separación del tejido sano, la posterior extracción de ARN total y su posterior análisis como se ha descrito anteriormente. El objetivo central en este caso es detectar y cuantificar la cantidad de ARN mensajero de interés, es decir, aquel que contenga la secuencia específica que codifique la enzima que se desea estudiar. Por último se procede a comparar el patrón obtenido con el tejido sano<sup>44</sup>.

#### b. Transcripción reversa y PCR (RT-PCR).

Este método combina la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el proceso de transcripción reversa, es decir, la conversión del ARN a ADN. El PCR es una técnica desarrollada durante los años ochenta por Kary Mullis y se basa en el descubrimiento de la actividad biológica a altas T° de las ADN polimerasas encontradas en bacterias termófilas<sup>56</sup>.

Tiene como propósito generar un gran número de copias de un fragmento de ADN de interés *in vitro*. La concentración de copias del gen aumenta exponencialmente, ya que en cada ciclo se copian las dos cadenas del ADN. Si se inicia la reacción con una copia del gen y éste es copiado en el primer ciclo, se ha de tener dos copias. En el segundo ciclo se a de concluir con la formación de cuatro copias, etc.

La transcripción reversa, tanto utilizando ARN total como ARNm, es la etapa clave en el proceso de RT-PCR<sup>57</sup>. Existen varios factores que influyen en la eficiencia del proceso, tales como la acción de la enzima que va a llevar a cabo esta reacción y la presencia de estructuras secundarias en el ARN<sup>58</sup>.



**Figura 8.** Análisis de Northern Blot. Se dan diferencias en las cantidades de ARNm entre tejidos normales (N) y tumorales (T). (Tomado de Coutinho y col, 1999)<sup>55</sup>

Las reverso transcriptasas virales, tales como M-MLV y AMV, han sido las enzimas de elección durante muchos años<sup>59</sup>. Estas enzimas, sin embargo, son termolábiles, y no pueden llevar a cabo la transcripción reversa cuando existen estructuras secundarias en el ARN. En este caso, se suelen utilizar transcriptasas reversas termoestables, que pueden llevar a cabo la reacción a 55-70 °C, permitiendo la desnaturalización de las estructuras secundarias, y aumentando la eficiencia global de la reacción<sup>60</sup>.

El método de RT-PCR permite medir la expresión génica mediante una técnica alternativa al Northern Blot. Es más sensible y requiere menos ARN. Sin embargo, la presencia de ARN o ADN contaminante, tanto en las muestras, como en el laboratorio y reactivos, debe ser evitada con el fin de impedir la aparición de productos inespecíficos<sup>61</sup>.

En el caso del estudio de tejidos cancerígenos se procede realizando la extracción de ARN del tejido, se efectúa la transcripción reversa y finalmente se lleva a cabo el PCR. Los resultados son finalmente comparados con los tejidos sanos<sup>62</sup>.

#### c. PCR en Tiempo Real.

Esta técnica se basa en la detección de un reportero fluorescente en cada ciclo de la reacción, por lo que el monitoreo es en tiempo real.

La señal de fluorescencia se incrementa de una forma directamente proporcional a la cantidad de producto de amplificación. Esto nos permite realizar análisis basándonos en la amplificación durante los primeros ciclos de la reacción y no al final de la misma, como con el PCR convencional.

Los métodos de detección utilizando la técnica de PCR convencional presentan varios inconvenientes, siendo el más serio el riesgo de resultados falsos positivos por contaminación con amplicones<sup>63</sup>. Como alternativa, se desarrolló la técnica del PCR en Tiempo Real, la cual es más rápida, sensible, precisa, práctica y, en principio, libre de problemas de contaminación<sup>64</sup>.

A grandes rasgos el procedimiento para el análisis de tejidos cancerígenos consiste en comparar los niveles de expresión de la secuencia de interés, expresados en número de copias, entre el tejido cancerígeno y el sano<sup>65</sup>.

#### d. Secuenciamiento.

El secuenciamiento es un procedimiento que requiere de la acción de la ADN polimerasa que sintetiza la cadena de ADN en presencia de nucleótidos trifosfato (dNTPs) y de análogos de los nucleótidos trifosfato (ddNTPs) acoplados a un compuesto radioactivo o cromogénico. Los ddNTPs interrumpen el proceso de síntesis del ADN ya que no permiten la elongación de la cadena sintetizada. La reacción de polimerización en estas condiciones genera fragmentos de ADN de tamaño variable, los cuales son separados por electroforesis y visualizados<sup>66</sup>.

Tiene como principal ventaja ser la herramienta por excelencia de análisis molecular ya que permite determinar con exactitud la secuencia de nucleótidos en una región específica o de interés y así detectar la presencia de mutaciones, re-arreglos genéticos y zonas polimórficas. Por otro lado, la gran desventaja que tiene esta técnica es el elevado costo de los equipos necesarios para llevarla a cabo<sup>67</sup>.

Para el estudio de tejidos cancerígenos el secuenciamiento ha sido una herramienta muy útil dado que ha permitido, por ejemplo, detectar un patrón de metilación del ADN característico de las células cancerígenas hepáticas con respecto a las células sanas del mismo órgano<sup>45</sup>.

## CONCLUSIONES

Se ha observado que en las células cancerígenas existe un cambio del metabolismo aeróbico<sup>69</sup>. A pesar de la aceptación de la importancia de la glicólisis en el cáncer se conoce poco acerca de cómo esta influencia en la expresión de genes de las enzimas sobre expresadas en este metabolismo<sup>5</sup>. La actividad incrementada y la expresión de estas enzimas son identificadas en tumores ya que más del 50% de su energía y sus precursores anabólicos derivan de la vía glicolítica<sup>47</sup>.

Se ha considerado como blanco para tratamiento al HIF-1<sup>26,27</sup>, a la HK-II<sup>29</sup>, y a la ATP citrato liasa<sup>19</sup>. Aun así, todos estos actúan conjuntamente con otras proteínas y no son las únicas maneras de crear una sobre-expresión de genes. Es por eso que se dificulta en la manera de encontrar un tratamiento eficaz para detener el crecimiento proliferativo y el desarrollo de las células cancerígenas.

Las técnicas para la sobre expresión de genes son diversas. Cada una de las presentadas en esta revisión cuenta con una serie de ventajas y desventajas lo cual le delega la responsabilidad al investigador de elegir la que más se adecue a sus objetivos experimentales y posibilidades económicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
2. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci*. 1999; 24:68-72.
3. Mathupala S. P., Rempel A, Pedersen P. Glucose catabolism in cancer cells. *The Biol Chem*. 2001; 276:43407-43412.
4. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956; 123:309-314.
5. Altenberga B, Greulichb K.O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*. 2004; 84:1014- 1020
6. Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL. Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:5992-7
7. Schulz T, Thierbach R, Voig A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer A, Ristow M. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin Inhibits cancer growth. *The J Biol Chem* 2006; 281:977-981.
8. Vogt AM, Elsasser A, Nef H, Bode C, Kubler W, Schaper J. Increased glycolysis as protective adaptation of energy depleted, degenerating human hibernating myocardium. *Mol Cell Biochem*. 2003; 242:101-7.
9. Carew JS., Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002; 1:9
10. Costello L, Franklin R. 'Why do tumour cells glycolyse?': From glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2005; 280:1-8.
11. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:891-9.
12. Nelson D, Cox M. *Lehninger's principles of biochemistry*. Fourth Edition. WH Freeman and Company. New York.2005. 521-525.
13. Bui T, Thompson C. Cancer's sweet tooth. *Cancer Cell* 2006; 9:419-420.
14. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*. 2006; 9:425-34.
15. Rivenzon-Segal D, Boldin-Adamsky S, Seger D, Seger R, Degani H. Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. *Int J Cancer* 2003; 107:177-82.
16. Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., and Thompson, C.B. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64:3892-3899.

17. Pardo G, Hernández P, Delgado R. La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Rev Cub Med* 2005. 44:1-12
18. Osthus R.C., Shim H., Kim S., Li Q., Reddy R., Mukherjee M., Xu Y., Wonsey D., Lee L.A., Dang, C.J. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *Biol. Chem.* 2000; 275:21797-21800.
19. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA, Thompson CB. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. 2005; 8:311-321.
20. Cuezva J.M., Krajewska M., de Heredia ML., Krajewski S., Santamaria G., Kim H. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* 2002; 62:6674-6681.
21. Rossignol R., Gilkerson R., Aggeler R., Yamagata K., Remington S.J., Capaldi R.A. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64:985-993
22. Verma M, Kagan J, Sidransky D, Srivastava S. Proteomic analysis of cancer-cell mitochondria. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:789-795.
23. Eigenbrodt, E., Fister, P., Reinacher, M. New perspectives in carbohydrate metabolism in tumor cells. In: Reitner, R. (ed). *Regulation of carbohydrate metabolism*. CRC Press. 1985; 2:141-179.
24. Mathupala S, Rempel A, Pedersen P. Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *The J Biol Chem* 1995; 270:16918-16925.
25. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998; 8:588-594.
26. Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Ravi R, Simons J, Taghavi P, Zhong H. The metabolism of tumours: 70 years later. *Novartis Found Symp.* 2001; 240:251-60.
27. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 2001a; 7:345-50.
28. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:721-32.
29. Obach M, Navarro-Sabate A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R. 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) gene promoter contains hypoxia-inducible Factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *The J Biol Chem.* 2004; 279:53562-53570.
30. Minchenko A., Leshchinsky I., Opentanova I., Sang N., Srinivas V., Armstead V., Caro J.J. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *Biol. Chem.* 2002; 277, 6183-6187
31. Chen C., Pore N., Behrooz A., Ismail-Beigi F., Maity AJ. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *Biol. Chem.* 2001; 276:9519-9525
32. Grandori C., Eisenman R. N. Myc target genes. *Trends Biochem. Sci.* 1997; 22:177-181
33. Shim H, Chun YS, Lewis BC, Dang CV. A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:1511-1516.
34. Pilkis S.J., Claus T.H., Kurland I.J., Lange A.J. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64, 799-835
35. Hue L., Rousseau G.G. Fructose 2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by growth factors, tumor promoters and oncogenes. *Adv Enzyme Regul.* 1993; 33, 97-110
36. Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26:30-35.
37. Hamilton JA, Callaghan MJ, Sutherland RL, Watts CK. Identification of PRG1, a novel progestin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Mol Endocrinol.* 1997;11:490-502.
38. Riera L, Manzano A, Navarro-Sabate A, Perales J.C., Bartrons R. Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1589:89-92
39. Chesney J. An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect, *Proc Natl Acad Sci* 1999; 3047- 3052.
40. Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., Mitchell, R., Bucala, R. *Cancer Res* 2002; 62:5881-5887
41. Sakakibara R, kato M, Okamura N, Nakagawa T, Komada Y, Tominaga N, Shimojo M, Fukasawa M. Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biochem (Tokyo)*1997; 122:122-128.
42. Rempel A., Mathupala S.P., Griffin C.A. Hawkins A.L., Pedersen P. Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. *Cancer Res* 1996; 56:2468-2471.
43. Hernandez M, Sanchez R. Control de la glucólisis en células tumorales de rápido crecimiento Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. 2005.
44. Arora K, Pedersen P. Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism.

- Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem.* 1988; 263:17422-17428.
45. Goel A, Mathupala S, Pedersen P. Glucose Metabolism in Cancer. *J Biol Chem.* 2003; 278:15333-15340.
46. Iyer N.V., Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998; 12:149-162
47. Kuhajda, F.P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition.* 2000; 16:202-208.
48. Towle, H.C., Kaytor, E.N., and Shih, H.M. Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu. Rev. Nutr.* 1997; 17:405-433.
49. Baggetto, L.G. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie.* 1992; 74, 959-974.
50. Bauer, D.E., Harris, M.H., Plas, D.R., Lum, J.J., Hammerman, P.S., Rathmell, J.C., Riley, J.L., and Thompson, C.B. Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J.* 2004; 18: 1303-1305.
51. Turyn, J., Schlichtholz, B., Dettlaff-Pokora, A., Presler, M., Goyke, E., Matuszewski, M., Kmiec, Z., Krajka, K., and Swierczynski, J. Increased activity of glycerol 3-phosphate dehydrogenase and other lipogenic enzymes in human bladder cancer. *Horm. Metab. Res.* 2003; 35:565-569.
52. Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313:459-465.
53. Haberkorn U. FDG uptake, tumor proliferation and expresión of glycolysis-associated genes in animal tumor models. *Nucl. Med. Biol.* 1994; 21:827- 834.
54. Porchet N, Aubert JP. Northern blot analysis of large mRNAs. *Methods Mol Biol.* 2000; 125:305-12.
55. Coutinho, Cláudia Malheiros, Bassini, Alessandra Simões, Gutiérrez, Leonardo Guilhermino et al. Genetic alterations in Ki-ras and Ha-ras genes in juvenile nasopharyngeal angiofibromas and head and neck cancer. *Sao Paulo Med. J.* 1999;117:113-120.
56. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155:335-50
57. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J of Mol Endocrinol.* 2002; 29:23-39
58. Phillips JK, Lipski J. Single-cell RT-PCR as a tool to study gene expression in central and peripheral autonomic neurones. *Auton Neurosci* 2000; 86:1-12
59. Menendez-Arias L. Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002; 71:91-147.
60. Zhang YJ, Pan HY, Gao SJ. Reverse transcription slippage over the mRNA secondary structure of the LIP1 gene. *Biotechniques* 2001; 31:1286-1290.
61. Roth CM. Quantifying gene expression. *Curr Issues Mol Biol* 2002; 4:93-100.
62. Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes* 2005; 19:101-109
63. Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e73.
64. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27:95-125.
65. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313:856-62.
66. Huang GM. High-throughput DNA sequencing: a genomic data manufacturing process. *DNA Seq* 1999; 10:149-53.
67. Franca LT, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* 2002; 35:169-200.
68. Espinosa JR. La hélice dorada y la medicina molecular. *Revi Diagnóstico* 2000; 39: 294-301.
69. Keleg S, Buchler P, Ludwig R, Buchler MW, Friess H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003;2:14. Review.

## CORRESPONDENCIA

Cynthia Gonzales-Castañeda  
e-mail: dah\_182@yahoo.com