

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

RECEIVED  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA  
MAY 13 1999

"EFECTO DE LA CERAMIDA EN LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES PROVENIENTES DE CERVIX HUMANO"

T E S I S

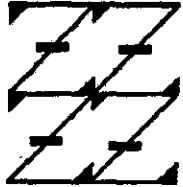
PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

GUTIERREZ IGLESIAS GISELA

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE

DE NUESTRA REFLEXIÓN

TESIS CON  
PALA DE ORIGEN

ASESOR: DRA. REBECA LOPEZ MARURE.

MEXICO, D. F.

1999

277942



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **DEDICATORIAS**

### **A MI QUERIDA FAMILIA:**

#### ***A mis padres:***

*Daniel y Rocío, a quienes amo por el amor y el apoyo brindado durante toda mi vida y doy gracias a Dios por tenerlos conmigo en esta meta realizada.*

#### ***A mi segunda mamá:***

*Julia, a quien quiero mucho y le doy gracias por su cariño, su apoyo y consejos para seguir adelante; y gracias por estar conmigo en esta etapa de mi carrera.*

#### ***A mis hermanas:***

*Elis, Carl y Nelly, que me han dado la suerte de crecer en un ambiente de armonía y unión en la familia.*

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA UNIDAD DE  
INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER, DE LA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" UNAM. BAJO  
LA DIRECCION DE LA DOCTORA REBECA LOPEZ MARURE**

## **AGRADECIMIENTOS:**

*Una vez más agradezco a Rebe por haber creído en mí para la realización de este trabajo y por sus sugerencias y opiniones.*

*Al Dr. Benny Weiss Steider, que es un ejemplo a seguir y por crear un laboratorio como es el de Diferenciación Celular y Cáncer.*

*A los miembros del Jurado:*

*Dr. Benny Weiss Steider.*

*Dra. Rebeca López Marure.*

*Dr. Edelmiro Santiago Osorio.*

*Dr. Luis Sánchez Sánchez*

*M. En C. Rosalva Rangel Corona.*

*Por sus sugerencias, las cuales enriquecieron este trabajo y por el apoyo en el laboratorio.*

*Al Dr. Edelmiro Santiago:*

*por su apoyo en los momentos difíciles y sus consejos.*

*A todos los miembros del laboratorio, que han contribuido a mi formación como investigador.*

*Al señor Ramulfo Pedraza por su valiosa asistencia técnica*

**A TODOS ELLOS "GRACIAS"**

## **DEDICATORIAS**

*A Alberto:*

*A quien quiero mucho por su cariño, apoyo incondicional y por alentarme a poner empeño en conseguir las metas que uno se propone.*

*A una amiga muy especial:*

*Gracias a Rebe por que ante todo existe una bonita amistad y yo le admiro por las cosas que ha logrado.*

*A mis amigos de la generación:*

*Caro, Vero, Toñita, Hirán, Selene, Hilda, Sandy, Gina, Miriam, Nacho, Arturo, Luis, Javier, César..., por que cada uno de ellos le puso un toque especial a nuestro grupo.*

*A mis amigos de la carrera:*

*Fernandito, Carlos, Chuy, Pedro, Gustavo, Lalo, etc.*

*A mis maestros:*

*Que hicieron que me gustara aún más la carrera de Biología.*

*Al maestro Fernando Tapia:*

*al que considero un amigo y le doy gracias por su apoyo.*

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>LOS LÍPIDOS COMO SEGUNDOS MENSAJEROS</b>	<b>3</b>
<i>El ciclo de la esfingomielina</i>	
<b>CERAMIDA</b>	<b>4</b>
- Descripción	4
- Estructura	5
<i>Activación de una esfingomielinasa ácida</i>	5
<i>Activación de una esfingomielinasa neutral</i>	7
<i>Síntesis de Novo</i>	7
- Blancos de la ceramida	8
- Efectos biológicos de la ceramida	
<i>Muerte celular o apoptosis</i>	11
<i>La ceramida y moléculas que participan en la apoptosis</i>	14
<i>Inhibición de la proliferación</i>	16
<i>Diferenciación</i>	17
- Otros efectos de la ceramida	18
- Vías de señalización de la ceramida	20
<b>CANCER</b>	<b>21</b>
- Cáncer cervicouterino	21
- Tratamientos o terapias del CaCu	22
- Características de las líneas caLo, InBl y HeLa	23
<b>JUSTIFICACION</b>	<b>25</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS</b>	
- Objetivo general	27
- Objetivos particulares	27

## **MATERIALES Y METODOS**

- <i>Obtención y cultivo de líneas celulares tumorales</i>	28
- <i>Incorporación del colorante cristal violeta</i>	29
- <i>Evaluación de la actividad metabólica por reducción de MTT</i>	29
- <i>Viabilidad celular por azul tripano</i>	30
- <i>Tinción de núcleos con Giemsa</i>	31
- <i>Análisis morfológico por tinción de núcleos con yoduro de propidio</i>	31
- <i>Incorporación de timidina tritiada</i>	32

<b>RESULTADOS</b>	33
-------------------	----

<b>DISCUSION DE RESULTADOS</b>	47
--------------------------------	----

<b>CONCLUSIONES</b>	52
---------------------	----

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	53
---------------------	----

<b>APENDICE</b>	64
-----------------	----



## ABREVIATURAS

- Bcl-2 Proteína animal homóloga a *Ced-9* protector de apoptosis  
C2 Ceramida 2  
C6 Ceramida 6  
C8 Ceramida 8  
CAPK Proteína cinasa dependiente de ceramida  
CAPP Proteína fosfatasa dependiente de ceramida  
Cer Ceramida  
CDKs Cinasas dependientes de ciclinas  
DAG Diacil-Glicerol  
DNA Acido Desoxirribonucleico  
FAS Receptor para Fas conocido también como APO y CD95  
G1 Fase Gap 1 del ciclo celular  
G2 Fase Gap 2 del ciclo celular  
ICE Enzima convertidora de Interleucina-1  
IFN- $\gamma$  Interferón gama  
I $\kappa$ B Inhibidor del factor de transcripción nuclear de la cadena k de anticuerpos producidos por células B  
IL-1 Interleucina-1  
JNK Proteína cinasa nuclear de Jun  
MAPK Proteína cinasa activada por mitógenos  
mRNA Mensajero del ácido ribonucleico  
MTT 3-(4,5-dimethylazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide  
NGF Factor de crecimiento neural  
NF- $\kappa$ B Factor de transcripción nuclear de la cadena k de anticuerpos de células B  
PBS Solución buffer de fosfatos  
PARP Poli (ADP ribosa) polimerasa  
PC Fosfolina  
PC-PLC Fosfatidilcolina dependiente de fosfolina  
PKC Proteína cinasa dependiente de calcio  
PKC- $\zeta$  proteína cinasa de tipo  $\zeta$   
PLA<sub>2</sub> Fosfolipasa A2  
PLC Fosfatidolcolina  
PMA 12-miristato B-acetato de forból  
RB proteína proveniente del gene del retinoblastoma  
RPMI 1640 Medio de cultivo  
S Fase de síntesis de DNA del ciclo celular  
SAPK Proteína cinasa activada por el estrés  
SFB Suero fetal de bovino  
SM Esfingomielina  
SMA<sub>s</sub> Esfingomielinasa  
TGF- $\beta$  Factor de crecimiento transformante beta  
TNF- $\alpha$  Factor de necrosis tumoral alfa  
TNFR1 Receptor de TNF tipo 1

## RESUMEN.

La ceramida es un lípido derivado de la hidrólisis de la esfingomielina, que forma parte de las membranas celulares. Se le ha atribuido un papel como segundo mensajero, ya que participa en la transducción de señales de varias citocinas. Entre sus principales efectos se encuentran la inhibición de la proliferación, el paro del ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis. Pese a todos los estudios realizados con ceramida, no se ha evaluado su efecto en células tumorales de cérvix humano. Es por ello que en este trabajo se estudió el efecto de la ceramida (C8) sobre la proliferación, el ciclo celular y la apoptosis de las células tumorales epiteliales de cérvix humano CaLo, InBl y HeLa.

La proliferación celular fue evaluada por la incorporación de cristal violeta, la actividad mitocondrial mediante reducción de MTT y la viabilidad por exclusión al azul tripano. Por otro lado, el efecto de la C8 sobre el ciclo celular se determinó por incorporación de timidina tritiada; la apoptosis, por la fragmentación de ADN en geles de agarosa y tinción nuclear por yoduro de propidio. La morfología fue evaluada por tinción con Giemsa-Wright. Los resultados muestran que la C8 inhibe la proliferación de manera dosis y tiempo-dependiente, y disminuye la actividad mitocondrial en todas las células tumorales. Cuando se usaron células epiteliales, fibroblastos y endotelios normales como controles comparativos, la C8 no indujo inhibición a las concentraciones que inhiben a las células tumorales. El efecto inhibitorio de la C8 se lleva a cabo en la fase G1, produce un paro en el ciclo celular y evita la transición a la fase S. Por otro lado, se observó que la C8 no induce apoptosis a las concentraciones en las que tiene un efecto antiproliferativo, sin embargo, se observaron cambios en las características morfológicas en el citoplasma y en el núcleo de las tres líneas tumorales. De los resultados obtenidos, se concluye que la C8 tiene un efecto inhibitorio de la proliferación mediante un paro en el ciclo celular, y que sus efectos se llevan a cabo en la fase G1; además, induce cambios morfológicos pero no apoptosis en células tumorales. Se sugiere su posible uso en la terapia de pacientes con cáncer cervico-uterino, ya que podría inhibir la proliferación de las células tumorales sin afectar la de las normales.

## INTRODUCCION

Una célula puede ser estimulada para proliferar o para detener su proliferación, dependiendo de las señales internas o externas que se le transmitan, y son de acuerdo a las necesidades de la misma célula (dependiendo del tipo celular del que se trate, su estado de maduración y su desarrollo), o pueden ser debidas al medio que las rodea. De cualquier forma, la célula capta esas señales y en su interior se activan diversos mecanismos, produciéndose lo que se llama una "vía de señalización", en la cual participan moléculas de distinta naturaleza química (enzimas, proteínas, azúcares y lípidos), que son capaces de inducir la activación de otras a manera de "cascada" y finalmente producir un efecto químico (estabilizar pH), físico (cambio de morfología, adherencia), biológico (proliferación, diferenciación) o bioquímico (ciclo de Krebs), entre otros. Se ha determinado que las vías de señalización pueden producirse a partir de las reacciones que desencadenan las uniones de los ligandos con sus receptores, que son moléculas protéicas situadas generalmente en la membrana plasmática. Los ligandos pueden ser moléculas activadoras o inhibidoras de la proliferación (Alberts, 1990). A los factores activadores se les conoce como mitógenos y promotores tumorales, y a los inhibidores como factores negativos o supresores tumorales; todos ellos son factores solubles, capaces de inducir reacciones en el interior de la célula a partir de la unión con los receptores, para que finalmente la células se divida o no (Johnson, 1994). Además de éstos, son varios los eventos en donde la membrana y los elementos que la conforman participan en las vías de señalización, de aquí la importancia que tienen las membranas en las funciones celulares, además de servir de envoltura semipermeable.

## **Los lípidos como segundos mensajeros.**

Las membranas celulares están constituidas en su mayor parte por moléculas de naturaleza lipídica formando lo que se conoce como bicapa lipídica. Las membranas presentan diferentes mezclas de lípidos, como los fosfolípidos, el colesterol y los glucolípidos; de éstos, los más abundantes en la membrana plasmática son los fosfolípidos y entre ellos los cuatro principales son: fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. (Alberts et al, 1994).

Anteriormente el papel que se les atribuía a los lípidos era solamente estructural, ya que establecen una barrera para la permeabilidad celular y propician la asociación de las proteínas de membrana. Posteriormente se observó que los fosfolípidos de membrana pueden hidrolizarse por enzimas activadas por ciertos mecanismos, y tales estudios llevaron al descubrimiento del ciclo de un esfingolípido: la esfingomielina. (Obeid et al, 1995).

### **El Ciclo de la esfingomielina**

El ciclo de la esfingomielina fue descrito por primera vez por Okazaki (1989) en las células leucémicas HL-60, en las cuales se observó que la vitamina D3 producía la hidrólisis reversible de la esfingomielina por la acción de una enzima llamada esfingomielinasa neutral, localizada en la membrana (Obeid et al, 1995), generándose un lípido llamado ceramida. Poco después, se observó que la ceramida también podía ser generada por la activación de una esfingomielinasa ácida, localizada en el citoplasma; y que al parecer, se producía en varios sitios subcelulares a través de estas enzimas en un pH óptimo (Chatterjee, 1993; Spence, 1993). La ceramida también puede generarse a partir de otros lípidos, llamándose a este proceso síntesis de *ново*.

Algunas de las vías descritas para la hidrólisis de la esfingomielina y la producción de ceramida, comienzan por la activación de varios factores y adición de citocinas; por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), induce la hidrólisis de la esfingomielina dentro de 45-60 minutos por la acción de una esfingomielinasa neutral o ácida, para producir a la fosfocolina y a la ceramida (Kolesnick, 1987; Kim et al, 1991; Okasaki et al, 1994; Jadayev et al, 1994).

#### **LA CERAMIDA.**

La ceramida es la molécula central en la estructura y metabolismo de los esfingolipidos; por lo tanto, todos ellos contienen ceramida como un componente básico hidrofílico (Yusuf et al, 1995). Recientemente se ha caracterizado como una molécula lipídica de señalización. (Kolesnick et al, 1998). Varios estudios hechos en diferentes líneas celulares muestran que la acción de diversos agentes extracelulares antagonistas como el TNF- $\alpha$ , el factor de crecimiento nervioso (NGF), la interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), la 25-dihidroxitamina D3, la dexametasona, los activadores del receptor Fas y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), inducen la activación de una esfingomielinasa neutral, que genera ceramida y fosfocolina (Ballou, 1992; Mathias, 1993; Hannun et al, 1994; Okasaki et al, 1994). (Fig 1).

No todos los tipos de ceramida pueden ser mediadores de todas las respuestas biológicas; se han realizado estudios en donde la dihidroceramida (la cual es precursora de la ceramida por la introducción de un doble enlace en los carbonos 4 y 5 en posición trans), no causa ningún efecto en cultivos celulares, por lo que ahora se sabe que la ceramida tiene su importancia en el doble enlace, debido a que sin él no se ejerce efecto alguno (Obeid et al, 1993). Por ejemplo, se ha observado que la dihidro-C6-ceramida tiene efectos mínimos sobre las células U-937. (Gassan et al, 1995)

Algunas de las vías descritas para la hidrólisis de la esfingomielina y la producción de ceramida, comienzan por la activación de varios factores y adición de citocinas; por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), induce la hidrólisis de la esfingomielina dentro de 45-60 minutos por la acción de una esfingomielinasa neutral o ácida, para producir a la fosfocolina y a la ceramida (Kolesnick, 1987; Kim et al, 1991; Okasaki et al, 1994; Jadayev et al, 1994).

## LA CERAMIDA.

La ceramida es la molécula central en la estructura y metabolismo de los esfingolípidos; por lo tanto, todos ellos contienen ceramida como un componente básico hidrofílico (Yusuf et al, 1995). Recientemente se ha caracterizado como una molécula lipídica de señalización. (Kolesnick et al, 1998). Varios estudios hechos en diferentes líneas celulares muestran que la acción de diversos agentes extracelulares antagonistas como el TNF- $\alpha$ , el factor de crecimiento nervioso (NGF), la interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), la 25-dihidroxitamina D3, la dexametasona, los activadores del receptor Fas y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), inducen la activación de una esfingomielinasa neutral, que genera ceramida y fosfocolina (Ballou, 1992; Mathias, 1993; Hannun et al, 1994; Okazaki et al, 1994). (Fig 1).

No todos los tipos de ceramida pueden ser mediadores de todas las respuestas biológicas; se han realizado estudios en donde la dihidroceramida (la cual es precursora de la ceramida por la introducción de un doble enlace en los carbonos 4 y 5 en posición trans), no causa ningún efecto en cultivos celulares, por lo que ahora se sabe que la ceramida tiene su importancia en el doble enlace, debido a que sin él no se ejerce efecto alguno (Obeid et al, 1993). Por ejemplo, se ha observado que la dihidro-C6-ceramida tiene efectos mínimos sobre las células U-937. (Gassan et al, 1995)

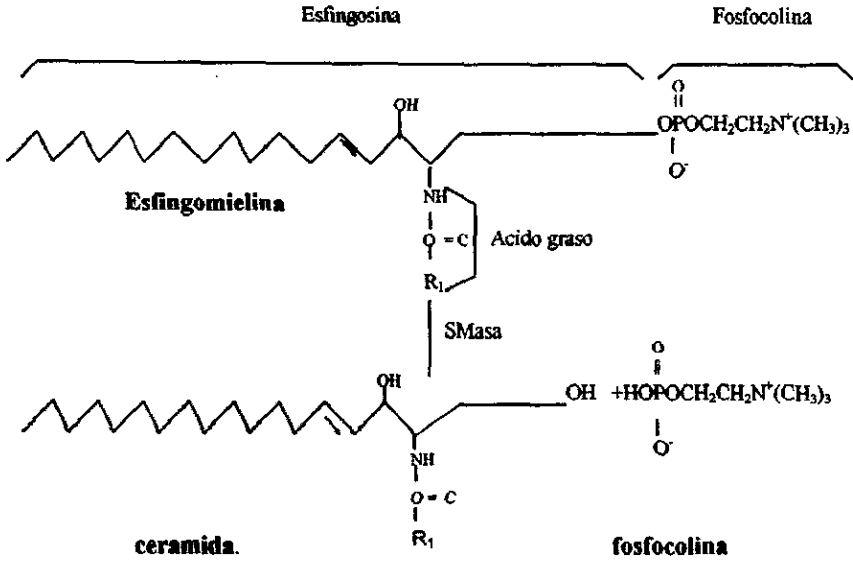


Figura 1. Hidrólisis de la esfingomielina a ceramida y fosfocolina. SMasa, esfingomielinasa.

**Activación de una esfingomielinasa ácida.**

Para el TNF- $\alpha$ , la activación de la esfingomielinasa ácida se inicia a través del dominio de muerte del receptor tipo I (TNFR1), en el extremo C-terminal, y hasta el momento se desconoce si su activación ocurre directa o indirectamente (Tartaglia et al, 1993; Wiegmann et al, 1994). En las líneas celulares U937 y Jurkat, se ha observado que el TNF- $\alpha$  inicia la activación de la fosfolipasa C dependiente de la fosfatidilcolina para producir diacilglicerol (DAG), el cual activa una esfingomielinasa ácida (Wiegmann et al, 1994; Machleidt et al, 1994). Cabe mencionar que la esfingomielinasa ácida produce a la ceramida en el compartimento lisosomal/endosomal (Spence et al, 1993; Merrill et al, 1993). La ceramida así formada estimula la transcripción del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), mediante la degradación de su inhibidor I $\kappa$ B. (Shütze et al, 1992). Esta vía se involucra en la citotoxicidad mediada por el TNF- $\alpha$  (Adam et al, 1996) (Figura 2).

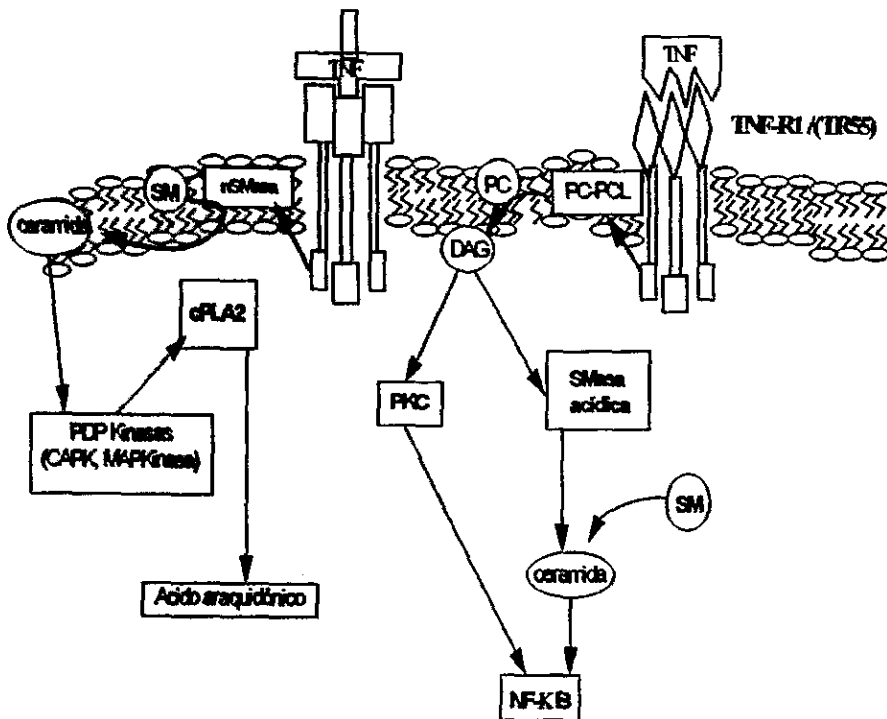


Figura 2. Producción de la ceramida a partir de la hidrólisis de la esfingomielinina por las esfingomielininas activadas por el TNF- $\alpha$ . TNF, Factor de Necrosis Tumoral alfa; TNF-R1, receptor 1 del TNF $\alpha$ ; SM, esfingomielinina; nSMase, esfingomielinina neutral; cPLA2, fosfolipasa A2; PC, fosfolipina; DAG, diacilglicerol; PC-PCL, fosfolipasa C dependiente de fosfatidilcolina; PKC, proteína cinasa C; CAPK, proteína cinasa activada por ceramida; MAPK, proteína cinasa activada por mitógenos; NF- $\kappa$ B, factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (Tomado de Wiegmann et al, 1994).



### ***Activación de una esfingomielinasa neutral.***

La activación del receptor del TNF- $\alpha$  se inicia en el residuo 345 del extremo N-terminal y da como resultado la activación de una esfingomielinasa neutral asociada a la membrana, la cual hidroliza a la esfingomielina en la capa externa de la membrana lipídica (Das et al, 1984) para producir ceramida y fosfocolina (Hannun et al, 1994). La ceramida que se forma, activa a una seril-treonil-cinasa dirigida por prolina y a la cascada CAPK/MAPK, que activa a la fosfolipasa 2A (Lin et al, 1993; Nemenoff et al, 1993), la cual puede mediar numerosas reacciones, incluyendo la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) y la estimulación de la transcripción de factores como *c-myc* y *c-fos* (Blenis et al, 1993) (Figura 2).

### ***Síntesis de Nova.***

Existe una vía recientemente descrita para la producción de la ceramida que es independiente de la cascada de las esfingomielinasas (Figura 3). Se propone que esta vía se inicia por la unión de la serina y la palmitoil-CoA, que resulta en la formación de 3-cetoesfingonina (3-cetodihidroesfingosina), que es posteriormente reducida a dihidroesfingosina. La dihidroceramida se forma por el enlace de un grupo acilo de un ácido graso a la dihidroesfingosina, y cuando se introduce un nuevo enlace en los carbonos 4 y 5 en posición *trans* de la dihidroceramida, se forma la ceramida (Rother et al, 1992). La ceramida sirve como penúltimo esfingolípido en diversas rutas del catabolismo de los esfingolípidos, ya que el rompimiento de ellos por la acción de las hidrolasas ácidas, resulta en la formación de la ceramida (Spence, 1993; Chatterjee, 1993); y por otro lado, sirve como precursor de otros esfingolípidos más complejos en el aparato de Golgi, como ceramida-1-fosfato, galactosilceramida, glicosilceramida o para formar nuevamente esfingosina (Spiegel et al, 1993; Dressler et al, 1990; Holleran et al, 1991), la cual puede formar ceramida o ser degradada. (Buehrer et al, 1992; Van Veldhoven et al, 1993).

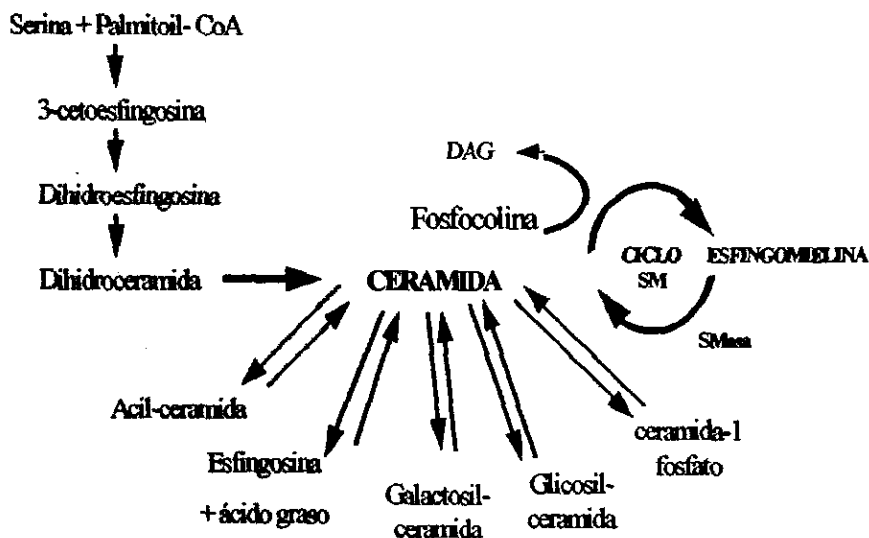


Figura 3. Modelo propuesto para la generación de la ceramida por la síntesis de *nov*o y por el ciclo de la esfingomielina (Tomado de Rother et al, 1992).

### Blancos de la ceramida

Se ha propuesto que la ceramida actúa como un segundo mensajero, activando varios blancos (Fig.4). La vía de señalización en donde participan las esfingomielinasas comienza cuando un ligando (L) (que puede ser un agente extracelular como  $TNF-\alpha$  o  $IL-1\alpha$ ) se une a su receptor (R), y se activa una esfingomielinasa (SMasa), la cual provoca la hidrólisis de la esfingomielina (SM) generando ceramida. La ceramida induce su efecto a través de varios blancos, incluyendo la proteína cinasa C de tipo  $\zeta$  (PKC- $\zeta$ ), la proteína fosfatasa activada por ceramida (CAPP) (Wolff et al, 1994; Dbaibo et al, 1995) y la proteína cinasa activada por ceramida (CAPK); algunos estudios proponen que también son activadas proteínas seril-treonil-cinasas dirigidas por prolina y la fosfolipasa 2A, (Wiegmann et al, 1994 121), las cuales inducen eventos intracelulares como la activación de  $NF-\kappa B$  (Yang et al, 1993; Weigmann et al, 1994) (Figuras 2 y 4). Así mismo se activan: la proteína Rb (producto del gene del retinoblastoma), la

regulación de la expresión del proto-oncogene *c-myc*, la inducción de la ciclooxigenasa (Cox) y la inhibición de la fosfolipasa D (PLD). Finalmente, los efectos biológicos que produce la activación de cualquier vía de señalización mediada por esfingomielinasas son la diferenciación, el paro del ciclo celular y la apoptosis, entre otros, dependiendo del tipo celular del que se trate (Pushkareva et al, 1995) (Figura 4).

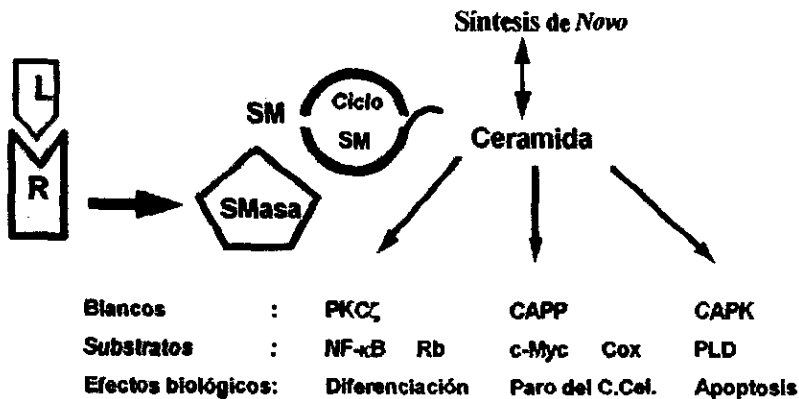


Figura 4. Modelo propuesto de la generación de ceramida, en donde se indican sus blancos, sus sustratos y sus principales efectos biológicos (Tomado de Pushkareva et al, 1995).

En estudios recientes se ha encontrado que la ceramida es capaz de mantener un estado hipofosforilado de la Rb. Cuando la Rb se encuentra hipofosforilada tiene una función muy importante como freno del ciclo celular y cuando se hiperfosforila, se inactiva llevándose a cabo la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. De este modo, cuando la ceramida mantiene el estado hipofosforilado de Rb, el progreso del ciclo celular se detiene. Por tal motivo, Rb se considera un factor blanco en la cascada de señales inducidas por la ceramida al inducir paro del ciclo celular (Dbaibo et al, 1995), y por tanto, un efecto anti-proliferativo (McConkey et al, 1996).

Se ha visto que un proto-oncogen que es afectado por la ceramida es *c-jun*, el cual se sobreexpresa cuando no se induce la expresión de A1, que es un factor de transcripción y es miembro de la familia del *bcl-2* (Karsan et al, 1996). En otros estudios realizados por Reyes et al (1996), se encontró que la ceramida exógena en células de carcinoma epidermoide, induce la rápida desforilación del producto del gene *c-jun*, por la activación de la CAPP, indicando que *c-jun* es un blanco de la CAPP. Así mismo, se ha encontrado que la CAPP comparte varias propiedades con la proteína fosfatasa 2A (PP2A), y se tiene la hipótesis que la ceramida puede activar directamente a la PP2A (Dobrowsky et al, 1993).

En algunas líneas celulares linfocíticas, se ha observado que la unión del ligando Fas a su receptor también produce la activación de la vía de la esfingomielina para producir ceramida, la cual induce la activación de Ras, que produce muerte celular apoptótica (Gulbins et al, 1995)

## EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA CERAMIDA.

### **Muerte celular o apoptosis.**

En estudios realizados previamente se observó que en tumores ováricos humanos (especialmente malignos), el contenido de las ceramidas disminuye, pero en cambio, se presentaban grandes cantidades de la esfingosina comparadas con las del tejido normal, sugiriendo una alteración en la biosíntesis de la ceramida. Así mismo se observó el efecto que tiene la ceramida como supresor de tumores, el cual es opuesto al que tienen los gangliósidos que es la supresión de la actividad antitumoral. (Dyatlovitskaya et al, 1997). Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y presentaron muerte celular después de ser tratadas con altas concentraciones de ceramida; tales células mostraron rasgos morfológicos y patrones de fragmentación de ADN característicos de la apoptosis. El daño en el ADN se relacionó con un incremento en la actividad de la proteína cinasa dependiente del ADN (MacManus et al, 1996). En líneas de fibrosarcoma murino L929/LM y WEHI 164/13 expuestas a ceramida sintética, se observó rompimiento de ADN genómico, con fragmentos característicos de apoptosis (Jarvis et al, 1994).

Se ha reportado que para células de cáncer de mama humano, la ceramida C-2 en la línea Hs578T induce apoptosis de forma dosis-dependiente (Gill et al, 1997) y para la línea MCF7 (también de cáncer de mama), la muerte celular puede presentarse al agregar C-6 o esfingomielinasa exógenas (Cai et al, 1997). Para el caso del linfoma de Burkitt's, la apoptosis inducida por la ceramida puede llevarse a cabo cuando las células presentan el antígeno CD77 (Taga et al, 1997). En otros estudios en donde se agregó ceramida C-2 a células de carcinoma de próstata, se observó que la vía de la apoptosis involucrada es la de ceramida/JNK (c-Jun NH2 terminal cinasa) (Herrmann et al, 1997); y en células linfocíticas T Jurkat al ser estimuladas con esfingomielinasa, aumenta el contenido endógeno de la ceramida, se activa el receptor Fas, que a su vez activa a Ras, a proteínas Rac formándose  $O_2$  y las células mueren por apoptosis inducida por estrés

oxidativo (Gulbinns et al, 1997). En fibroblastos normales de piel y en células endoteliales cerebrales de bovino normales, la ceramida también activa la señalización de muerte (Jaffrézou et al, 1998; Xu et al, 1998). Por todos estos efectos biológicos, se ha considerado a la ceramida como un mediador de los efectos citostáticos y citotóxicos del TNF- $\alpha$  en células linfoides y no linfoides (Dbaibo et al, 1993).

En células leucémicas del linaje monocítico U-937 y promielocítico HL-60 (ambas humanas), se ha visto que al ser tratadas con la daunorubicina, se la activación de una esfingomielinasa neutral e hidrólisis de la esfingomielina, se aumenta la producción de ceramida endógena y se presenta muerte celular programada a pesar de la sobreexpresión del gene *bcl-2*, formando así una retroalimentación positiva entre la ceramida y la activación de la esfingomielinasa neutral (Jaffrézou et al, 1998). Estos eventos son abatidos por inhibidores de proteasas, pero la respuesta apoptótica puede ser recuperada agregando ceramida exógena C-6 (25  $\mu$ M) (Marisat et al, 1997). En otros estudios, se ha observado que tanto la línea HL-60 como U-937 tratadas con ceramida, sufren apoptosis (Shellhaas et al, 1995; Ji et al, 1995); probablemente porque existe una baja regulación de los niveles de ARN mensajero para el *bcl-2* (Chen et al, 1995) y también para *c-myc* (Wolff et al, 1994). El fenómeno de apoptosis se corrobora por la fragmentación de ADN en geles de agarosa y por morfología. (Jarvis et al, 1994). Sawai et al (1995), observaron que para inducir apoptosis, se incrementaban los niveles del ARN mensajero para *c-jun* de una manera dosis dependiente al agregar ceramida (Sawai et al, 1995). Para la línea celular U-937, se ha observado fosforilación de tirosina de la proteína p23 como blanco de la ceramida (Ji et al, 1995) y fragmentación de ADN cuando se agrega ceramida exógena menor a 25 nM (Wright et al, 1996; Ji et al, 1995). Quillet Mary en 1997, reportó que además de lo anterior, en la misma línea leucémica, la ceramida induce producción significativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, activando a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1, que son mediados por especies reactivas al oxígeno derivadas de la mitocondria y el resultado de este proceso es la apoptosis (Quillet et al, 1997). Estudios realizados en esas mismas células y en KG1a (línea del mismo origen) al ser tratadas con ceramida sintética, ceramida natural y ceramida inducida por TNF- $\alpha$  se presenta muerte celular dosis-dependiente con los tres tipos de ceramida utilizados

(Bettaieb et al, 1996).

En células leucémicas L1210, las ceramidas C-2 y C-6 (8.3 y 1.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente) inhiben el crecimiento celular y la incorporación de timidina tritiada, y una disminución en la expresión de *c-myc*, los cuales se consideran eventos tempranos a la apoptosis (Flamigni et al, 1997). En células gliales C6 (macrófagos de rata), la ceramida C-6 disminuye la cantidad de PLD (fosfolipasa D) dependiente de GTPgammaS (guanosina 5'-O-(3-trifosfato) e induce apoptosis 12 horas después del tratamiento con ceramida a 25  $\mu\text{M}$ . Esto demostró que la ceramida es capaz de disminuir los niveles de enzimas de PLD (Yoshimura et al, 1997). En la línea celular leucémica CMK-7 cultivada con ceramida en ausencia de suero, se induce apoptosis después de las 18 horas (Sweeney et al, 1996).

Algunos trabajos mencionan que la ceramida se ha identificado como un mediador de apoptosis en la línea celular derivada de linfoma B murino WEHI 231, ya que al exponer a las células a ceramida exógena, éstas mueren por apoptosis, y en el caso de irradiación o tratamiento con la dexametasona, presentan acumulación de ceramida y muerte (Quintans et al, 1994).

En células derivadas de cáncer de páncreas (líneas MLAPaCa-2, PANC-1, PK1 y PK-9) cultivadas a bajas concentraciones de suero y ausencia de insulina, presentan una supresión del crecimiento celular al ser tratadas con ceramida en altas concentraciones (Yamada et al, 1997). En carcinoma de colon humano (células HT29rev), se presenta muerte celular programada cuando se someten a un tratamiento con ceramida C2 (Vieldman et al, 1998).

En las líneas de células T linfoblásticas CEM-C7H2 tratadas con análogos de ceramida (C-2, C-6 y C-8), se presenta muerte celular por apoptosis (Geley et al, 1997). En 1996, Olshefski y su grupo de trabajo, propusieron que la ceramida exógena afectaba a la proliferación de linfocitos *in vitro*, lo que no ocurre con los gangliósidos exógenos que contienen ceramida en su propia estructura, lo que señala que los gangliósidos y los esfingolípidos tienen una diferente vía de inhibición y muerte celular.

## **La ceramida y las moléculas que participan en la apoptosis.**

Existen evidencias del papel que tiene la ceramida en la apoptosis mediada por Fas, ya que se ha encontrado que al incubar durante 24 horas a las células SKW 6.4 con el anticuerpo dirigido contra Fas, la cantidad de ceramida dobla la concentración inicial, aunque el efecto de muerte celular no es mayor que el de las células con anti-Fas solo; de ésto se propone que la ceramida es producida a consecuencia de los procesos iniciados por las caspasas (Sillence et al, 1997). Previos estudios con la ceramida han demostrado que la estimulación con la ceramida sintética activa la vía de señalización de Fas, en donde interviene la proteína cinasa Jun (JNK) (Latinis et al, 1996). Por otra parte, se sabe que la producción de la ceramida induce la activación de una proteasa inhibidora de las enzimas convertidoras de Interleucina-1 beta (ICE) y de sus proteasas relacionadas (pICE), que rompen el sustrato de muerte de la poli (ADP-ribosa) polimerasa. Así mismo, se encontró que el *bcl-2* es capaz de inhibir la muerte celular inducida por la ceramida, mas no su generación. Contrario a este proceso, la citocina A modificadora de respuesta (CrmA), un potente inhibidor de pICE, puede ser bloqueada si la ceramida exógena sobrepasa los niveles de la CrmA. Esto indica el papel que la ceramida puede tener en relación a las proteasas involucradas en la muerte celular programada (Smyth et al, 1996; Dbaibo et al, 1997). Sillence y colaboradores (1997), consideran que a consecuencia de estos eventos, se puede inducir un incremento en la concentración de calcio citosólico.

Se ha estudiado la relación entre la vía de supresión del crecimiento mediada por la ceramida y el proto-oncogene *bcl-2* en células leucémicas ALL-697. Cuando se indujo la producción de ceramida por medio de la adición del agente quimioterapéutico vincristina, el nivel de la ceramida aumenta a las 12 horas y produce muerte celular; sin embargo, la expresión del *bcl-2* protege de la apoptosis en respuesta a la ceramida, mostrando que el *bcl-2* es un blanco efector de la ceramida y que éste, no interfiere para que la ceramida active a la Rb o para inducir un paro en el ciclo. Esto sugiere que los



efectos de la ceramida en el ciclo celular pueden ser disociados de los efectos de la apoptosis (Zhang et al, 1996). Algunos reportes muestran que cuando el TNFR1 se activa, existe una ruptura del extremo N-terminal de los transductores de señalización para producir apoptosis: FADD/MORT1, apoptosis inducida por CD95, generación de ceramida y activación de la proteasa de muerte Yama/ CPP32 (Chinnaiyan et al, 1996). En ésta última, se ha estudiado que cuando la ceramida no parece un mediador de TNF- $\alpha$  o de la apoptosis inducida por Fas, ésta puede ser generada como una consecuencia de la activación de CPP32 y puede contribuir al despliegue de la señal de la muerte intracelular (Gamen et al, 1998).

En estudios realizados con células endoteliales aórticas bovinas expuestas a radiación ionizante, se observa una activación de la vía de señalización de la ceramida, participando en ésta una proteína seril-treonil cinasa. La apoptosis inducida es bloqueada por la PKC, sugiriendo que en la vía de apoptosis están involucradas proteínas cinasas con diversos blancos (Haimovitz et al, 1994).

### **Inhibición de la proliferación.**

En las células leucémicas promonocíticas HL-60 tratadas con ceramida exógena se ha observado una supresión del crecimiento acompañada por un paro del ciclo celular en la fase G0-G1 (Bielawska et al, 1996). Otros autores han descrito que puede observarse apoptosis e inclusive diferenciación celular en esas células, dependiendo de la concentración de ceramida y de la densidad celular que se utilice (Bielawska et al, 1993). Para la línea celular de neuroblastoma Neuro 2a, se ha demostrado que cuando son expuestas a condiciones experimentales que aumentan los niveles de ceramida, se inhibe la proliferación y se estimula el crecimiento anormal de las neuritas (Riboni et al, 1995). En otros estudios se ha observado una inhibición del crecimiento para células de cáncer humano, misma que se correlaciona con un incremento en los niveles de ceramida celular y diglicéridos causada por drogas quimioterapéuticas (Abe et al, 1995).

Estudios realizados con las células de leucemia linfoblástica MOLT-4 demuestran que al ser estimuladas con ceramida C6, las células presentaron una desfosforilación de la proteína Rb (uno de los blancos de la ceramida), produciéndose una supresión del crecimiento y un paro en la fase G0-G1 del ciclo celular (Dbaibo et al, 1995; Pushkareva et al, 1995).

En células derivadas de glioma de rata, los análogos de ceramida permeable a las células inducen el mismo efecto que el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), sobre la inhibición del crecimiento y la intervención en los procesos de maduración. Estos efectos parecen estar mediados por el receptor p75NT en la línea T9 y en las células NIH 3T3, en las cuales el p75NT está sobreexpresado (Dobrowski et al, 1994).

## Diferenciación

Existen reportes que la 1-beta-D-arabinofuranociltocina (ara c) en la línea HL-60 provoca la activación del ciclo de la esfingomielina, lo que produce un incremento en los niveles de ceramida endógena, induciéndose diferenciación monocítica por medio de la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Strum et al, 1994). Así mismo, en las células SH-SY5Y y Neuro2a, los tratamientos capaces de aumentar el nivel de ceramida (como esfingosina o ceramida C2), inducen diferenciación (Tettamanti et al, 1996).

En células gliales fetales humanas transformadas, se ha observado que la ceramida se encuentra en un alto porcentaje de los glicolípidos contenidos en éstas, los cuales pueden estar involucrados en la diferenciación y el crecimiento celular (Ariga et al, 1996).

Cuando las células NIE-115 derivadas de neuroblastoma de rata son expuestas a la ceramida, las células presentan una disminución drástica en los niveles de diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico (PA) y disminución de la actividad de la fosfolipasa D, que son indispensables en altos niveles para la vía de señalización de la diferenciación; por tanto, al verse disminuidas provocan des-diferenciación en tales células (Clejan et al, 1996).

El cultivo de queratinocitos humanos de la línea DJM-1 (cáncer de células escamosas), donde se ha agregado ceramida y sus análogos, ha mostrado una diferenciación significativa, una sobre-regulación de la formación de la envoltura cornificada, una síntesis de involucrina, un incremento de actividad de trasglutaminasa y una inhibición de la proliferación (Wakita et al, 1994).

### Otros efectos de la ceramida.

Nakabo et al (1997), investigaron el efecto de las ceramidas C2 y C6 en las funciones de los monocitos humanos. Después de inducir a las células a la producción de altas cantidades de superóxido adicionando LPS (lipopolisacárido) e IFN $\gamma$ , las células fueron tratadas con ceramida, observándose una inhibición en la liberación de O $_2^-$ . Por otra parte, se observó que la C2 (20 $\mu$ M) indujo la secreción del TNF- $\alpha$  y la Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) en los monocitos, mostrando así que la C2 actúa como un antagonista del LPS (Nakabo et al, 1997).

En las células MOLT-4, se ha observado que la fosforilación de la proteína Rb inducida por el PMA se inhibe por la acción de la ceramida, ya que se inhibe a la proteína cinasa C, que es un blanco primario del PMA y que se encuentra involucrada en la vía de señalización de la ceramida. Así mismo, se mostró inhibición de la isoforma  $\alpha$  de la proteína cinasa C con las C2 y C6 y el efecto fue dosis-tiempo-dependientes (Lee et al, 1996).

Cuando las células Fao de hepatoma de rata sensitivas a la insulina fueron incubadas con ceramida C2 o C6, presentaron una fosforilación de tirosina en el IRS-1 (sustrato 1 del receptor de la insulina) inducido por la insulina; esta misma actividad se había observado previamente cuando las células se trataron con TNF, sugiriéndose que la vía de la esfingomielina está involucrada en la fosforilación del IRS-1 estimulado por la insulina (Kanety et al, 1996).

Otro efecto observado con la ceramida exógena en células de rata de origen leucémico basófilo, es la inhibición de la activación de la fosfolipasa D inducida por PMA o por Ag (plata), lo cual ocasionó un bloqueo del flujo de calcio (Ca $^{2+}$ ) y una traslocación de la proteína cinasa C dependiente de calcio y liberación de serotonina (Nakamura et al, 1996). En las células HL-60, la ceramida fue fosforilada por la proteína cinasa dependiente de calcio y además indujo un incremento dosis y tiempo-dependiente en los niveles de diacilglicerol celular (Younes et al, 1993).

En fibroblastos gingivales, la ceramida estimuló predominantemente la actividad de la proteína básica de mielina (BMP), la cual se ha visto que es activada por la IL-1 (Bird et al, 1994).

Esteroisómeros de la N-octanoyl-esfingosina (ceramida C8) tienen la capacidad de inducir apoptosis o inhibición del crecimiento celular aún sin el grupo carbonilo; el cual fue sustituido por un grupo metileno (Karasavvas et al, 1996; Bielawska et al, 1993). Resultados obtenidos en las células gliales C6 muestran que al ser tratadas con PDMP (sustancia utilizada en la quimioterapia), existe una acumulación de ceramida, relacionando este fenómeno con el efecto causado por tal sustancia (Radín, 1994).

La hidrólisis de la esfingomielina y la producción de ceramida fue estudiada en la línea celular de intestino humano CaCo-2, la hidrólisis de la esfingomielina produjo una disminución de la secreción basolateral de la masa de triacilglicerol, masa de apo B y actividad de PKC (Field et al, 1993). En las células de timoma EL4, la hidrólisis de la esfingomielina inducida por IL-1, provocó un aumento en la actividad de la CAPK (Mathías et al, 1993).

En células derivadas de carcinoma epidermoide humano (A431), la C8 indujo la fosforilación tiempo-dependiente del receptor del EGF y se incrementaron los niveles endógenos de la ceramida (Goldkorn et al, 1991).

En las células progenitoras (BCR-ABL<sup>+</sup>) derivadas de leucemia mieloide crónica, la ceramida ocasionó un efecto dosis dependiente en la sensibilidad a la muerte celular, además se logró estudiar que se presentaba un incremento secuencial en la fosforilación de la tirosina de las proteínas p210B<sup>CR-ABL</sup>, p46-56<sup>SHC</sup> y p120<sup>Cbl</sup> (Satta et al, 1998).

Recientemente se ha encontrado que en los cardiomiocitos neonatales de rata, la C2 está involucrada en la muerte apoptótica *in vitro* ocasionada por isquemia (deprivación de glucosa, suero y oxígeno), y que tiene la capacidad de formar vaselina cuando se readicionan los anteriores componentes, aumentando así la sobrevivencia (Bielawska et al, 1997).

El tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con C6, disminuye el mRNA de GLUT4 (transportador de glucosa en respuesta a la insulina), debido a una disminución de la transcripción del gene, y se propone que la ceramida participa en un mecanismo para controlar la expresión del gene GLUT4 (Long et al, 1996).

#### **Vías de señalización de la ceramida.**

Se sabe que la vía ceramida/SAPK/JNK es requerida para la apoptosis inducida por el estrés, ya que ha sido reportado recientemente que la ceramida activa a la proteína cinasa activada por el estrés (SAPK), así como a la cinasa Jun (JNK), que es miembro de la subfamilia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP) (Verheig et al, 1996). Se ha propuesto que la TAK-1 (un miembro de la familia de las MAP) es capaz de activarse por el tratamiento de agentes estresantes (incluyendo la ceramida), que provocan un aumento de la ceramida, e inducen la actividad cinasa de la TAK-1. La expresión de la forma activa de la TAK-1 puede inducir la vía SAPK/JNK y SEK1/MKK4, un activador directo de SAPK/JNK; sin embargo, la forma negativa de la TAK-1 interfiere con la activación de tal vía inducida por la ceramida, lo cual indica que la TAK-1 puede funcionar como un mediador de la vía de activación de SAPK/JNK (Shirakabe et al, 1997). En la línea celular Kasumi-1 tratada con ceramida exógena, se observa una activación de la PK35, la cual puede estar involucrada en la vía de señalización de muerte inducida por el TNF- $\alpha$  (Ido et al, 1996).

AÑO Autor	CELULAS	ORIGEN	EFFECTOS DE LA CERAMIDA	GENES O VIAS DE LA TRANSDUCCION DE SEÑALES
1998 Savvi et al.	HL-60	células promielocíticas humanas	diferenciación	aumenta la activación de NFκB y AP-1, disminuye el mRNA de Bcl-2
1991 Goldorn et al.	A-431	carcinoma epidermoide	-----	fosforila el receptor de EGF
1993 Field et al.	Caco-2	células intestinales humanas	disminuye la secreción basolateral de (transilglicero)	estimula la actividad de PKC
1993 Mebius et al.	EL-4	células de timoma	-----	aumenta la actividad de PKC estimulada por IL-1
1993-94 Dobrowolny et al.	J9	células de glioma y cerebro de rata	imita efectos del NGF en inhibición	mediante receptor p75 NRT, activa a la proteína fosfatasa 2A
1994 Wakis et al.	DIM-1	carcinoma de células endocervicadas	diferenciación y crecimiento	-----
1995 Mc Giban et al.	K562	leucemia mielógena crónica	apoptosis	FAS, Ceramida, Bcr, Abi
1995 Cifano et al.	Hot78	células de linfoma	apoptosis	SM, PLC y PLA-2 - FAS/APO-1
1995 Dharbo et al.	MOLT-4	células leucémicas T linfocitos	Paro del ciclo celular en G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	Rb hipofosforilado
1996 Chimura et al.	WEHI	leucemia promielocítica de ratón	apoptosis	PKC's
1996 Tetsunomi et al.	Neuro 2a, SH-SY5Y	neuroblastoma	diferenciación	-----
1996 Chojan et al.	N1E-115	neuroblastoma	desdiferenciación	PLD activa fosfolipasa C
1996 Ito et al.	KASUMI-1	leucemia mielóide aguda	apoptosis	aumenta actividad de PKC3 y otras
1996		células de gránulos cerebrales	diferenciación	-----
1997 Ohmori et al.		cáncer de colon humano	apoptosis	-----
1997 Taga et al.		linfoma de Burkitt's humano	apoptosis	activa Ki-ras
1997 Quilis et al. J.L. et al.	U-937	leucemia mielóide humana	apoptosis	fosforita p23, activa NFκB y aumenta la cantidad de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1997 Hermann et al.		carcinoma de próstata	apoptosis	JNK/SAPK
1997 Gulbins et al.	JURKAT	linfocitos T leucémicos humanos	apoptosis	receptor de FAS activa a FAS
1997 Jadjev et al.	L 929	fibroblastos	citotoxicidad	TNF, acumulación de ceramida pPLA-2, NFκB.
1997 Yoshimura et al.	C <sub>6</sub>	células gliales de rata	apoptosis	-----
1997 Dvalatvashvaya et al.		células de tumor ovárico	apoptosis	-----

Resúmen de los efectos de la ceramida y vías de señalización reportados por varios autores desde 1990.

## CANCER

La proliferación incontrolable de las células da lugar a que se desarrolle un tumor, éste puede ser maligno o benigno. El cáncer representa a los tumores malignos; en los cuales, la proliferación de las células doblan su número en menor tiempo en que lo hacen las normales, y llega a un grado en que se pone en peligro la integridad del organismo, debido a que la proliferación no solo afecta al órgano en que se originó, sino también puede invadir a otros órganos. Esto hace que un tumor maligno, si no es atendido inmediatamente, en poco tiempo invada otros sitios (metástasis), siendo no localizado y mortal. A diferencia del cáncer, los tumores benignos, proliferan de una forma en que su crecimiento finalmente no pone en riesgo la estabilidad funcional del organismo en el cual se alojan. Generalmente el padecimiento no va más allá de la aparición de un tumor ligero sin repercusiones para el organismo, permitiendo ser localizado y extirpable.

### Cáncer cervicouterino (CaCu).

El cáncer cervico-uterino (CaCu) es la primera causa de mortalidad en la mujer mexicana, según reporta el Sistema Nacional de Salud (Ramírez, 1991-1992). En 1990, el índice calculado en mujeres de 25 o más años de edad fue de 24.9%, y se calcula el 30.1% para el año 2000. En mujeres mayores de 45 años, presenta un incremento de 30.7 a 53%.

El CaCu es de tipo epidermoide en un 85 a 90% de los casos y aparece en la unión del canal cervical y del ectocérvix (Escandón et al, 1992), lugar donde las células pueden sufrir transformaciones por la acción de uno o más factores denominados factores de riesgo, los cuales pueden ser biológicos (mutaciones genéticas heredables, virus como el del papiloma humano y edad), sociales y culturales (baja escolaridad), y a los que estamos expuestos todos los seres humanos: los ambientales (García et al, 1993; Escandón, 1992; Lazcano et al; 1993; Isakova et al, 1995).



### **Tratamientos o terapias del CaCu.**

El tratamiento que las mujeres pueden recibir para los tumores, depende del órgano que se vea afectado y del estadio en que se encuentre el tumor. Los métodos principales para tratar el CaCu son los siguientes:

1) Cirugía.- son las biopsias por escisión (con suficiente tejido circundante no afectado); éste tipo de tratamiento para el CaCu es eficiente cuando el tumor se diagnostica tempranamente.

2) Radioterapia.- es el tratamiento que se realiza por medio de las radiaciones, el cual puede curar el cáncer de ciertas localizaciones en el cuello uterino. Los aparatos que se utilizan en este caso son los de cobalto y algunos aparatos de alta energía.

3) Quimioterapia.- consiste en la administración de ciertos fármacos con efecto antineoplásico como el cis-platino y el fluorouracilo (FU) para controlar el crecimiento tumoral, pero esta técnica sólo tiene éxito cuando se utiliza en los estadios iniciales de la enfermedad (OMS, 1995).

## **Características de las líneas CaLo, InBl y HeLa (provenientes de CaCu).**

### **CaLo.**

**Edad de la paciente:** 55 años

**Diagnóstico clínico:** Carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizadas con HPV-18.

**Descripción microscópica:** Las células muestran núcleos pleomórficos con mitosis atípicas. Escaso citoplasma eosinófilo y núcleos centrales. forman grupos en mosaico.

**Estadio clínico:** II B (Monroy, 1991).

**Características del estadio:** El estadio II B es considerado como cáncer microinvasor de alto riesgo. Es tratado con ciertos agentes químicos en combinación con radioterapia. (Krebs, 1992).

### **InBl**

**Edad de la paciente:** 45 años

**Diagnóstico clínico:** Carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizantes con HPV-18.

**Descripción microscópica:** Células grandes con núcleos hiper cromáticos. Mitosis atípicas y formación de perlas córneas.

**Estadio clínico:** IV B (Monroy, 1991).

**Características del estadio IV B:** El estadio IV B es considerado al igual que el II B, como un cáncer microinvasor de alto riesgo. Por lo general se recurren a otros tratamientos colaterales a radioterapia; dependiendo de todas las características en conjunto que se presenten. En la etapa IV B, el tratamiento que se usa para las mujeres en estadio II B, ya no es tan efectivo y las posibilidades de supervivencia es menor. Asimismo el tiempo entre el tratamiento y la reincidencia es menor en la etapa IV B.

Las estadísticas que se conocen, señalan que el tratamiento con radiaciones produce resultados semejantes en los estadios I y II, controlando el mal en un 84 y 67%, respectivamente. En tanto que en las etapas III y IV, el porcentaje oscila entre el 20 y 30%. (Krebs, 1992).

**HeLa.**

**Edad de la paciente:** 31 años

**Diagnóstico clínico:** Adenocarcinoma de cérvix con HPV-18.

**Descripción microscópica:** Células epiteliales.

**Estadio clínico:** IV B metastásico (invasivo). (ATCC).

**Características del estadio:** Este estadio es maligno con un alto riesgo de mortandad, con pocas posibilidades de curación y el riesgo de invadir otros órganos se encuentra en un porcentaje considerable. El tratamiento depende de las características que se presenten, (como los patrones de invasión ) (Ruíz et. al. 1994), pero el porcentaje de supervivencia es mínimo.

## JUSTIFICACION

Actualmente, los factores involucrados en las vías de señalización de la proliferación celular son investigados. Una de las vías activadas principalmente por factores inhibidores, es la vía de la esfingomielina a ceramida. La ceramida es un lípido (producto de esa vía), que se ha caracterizado por participar como segundo mensajero en la transducción de señales de varios agentes extracelulares como el TNF $\alpha$ , el IFN $\gamma$ , y la IL-1 $\beta$ , y el efecto que se produce, depende de la concentración que se utilice y del tipo celular del que se trate. Se ha observado que en diferentes tipos celulares en presencia de ceramida agregada exógenamente, se producen respuestas como la muerte celular programada (o apoptosis), el paro del ciclo celular y la inhibición de la proliferación. Pese a los estudios realizados con ceramida, no se ha estudiado el efecto que ésta tiene sobre células tumorales derivadas de CaCu, por lo que se considera de importancia evaluar el efecto que este lípido produce. Se tienen antecedentes de que el cáncer cervico-uterino es una de las primeras causas de muerte en las mujeres de México, y las alternativas de terapia que existen, resultan agresivas para las pacientes y altamente costosas. La importancia clínica que tiene este trabajo, es que en el caso de que la ceramida pudiera estar induciendo a las células a detener su proliferación, se estarían aportando conocimientos para una posible administración de ceramida exógena a los tumores, y que en conjunción con alguno de los tratamientos conocidos, se pudiera emplear en un futuro, sin resultar agresivo ni costoso para la paciente. Así brindar nuevas esperanzas de sobrevivencia para las mujeres con el padecimiento maligno del CaCu.

## **HIPOTESIS:**

Se tienen evidencias de que la ceramida actúa como segundo mensajero en la transducción de señales activadas por factores extracelulares. Entre sus principales efectos en líneas celulares de diversos orígenes se encuentran la inhibición de la proliferación, la apoptosis y el paro del ciclo celular. Nosotros esperamos que en las células tumorales de cérvix como CaLo, InB1 y HeLa, al ser estimuladas con la ceramida C8, se presente un efecto inhibitor de la proliferación acompañado con un paro del ciclo celular y se desencadene apoptosis.

## **OBJETIVO GENERAL:**

**Evaluar el efecto de la ceramida C8 sobre la proliferación, el paro del ciclo celular y la apoptosis en las células tumorales provenientes de cérvix humano CaLo, InBl y HeLa .**

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1) Evaluar el efecto de la ceramida sobre la incorporación del colorante cristal violeta como medida de proliferación celular.**
- 2) Evaluar el efecto de la ceramida sobre la actividad mitocondrial y viabilidad celular por medio de la reducción de MTT y por exclusión por azul tripano respectivamente.**
- 3) Determinar si el efecto de la ceramida es tiempo y dosis-dependiente, evaluando la proliferación celular a diferentes tiempos y concentraciones.**
- 4) Evaluar si la ceramida inhibe la síntesis de ADN y determinar si su efecto se lleva a cabo en la fase G1 del ciclo celular, por medio de la incorporación de timidina tritiada.**
- 5) Evaluar si la ceramida induce apoptosis y cambios morfológicos, determinando la fragmentación de ADN en geles de agarosa y por medio de tinciones con yoduro de propidio y Giemsa-Wright, respectivamente.**

## MATERIALES Y METODOS

### **Obtención y Cultivo de Líneas Celulares Tumorales.**

Las células tumorales CaLo e InB1, fueron obtenidas a partir de biopsias de carcinoma de cérvix humano en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer; las células Hela fueron compradas al American Type Cell Cultive (ATCC). Todas las células se sembraron en cajas de cultivo de 60 mm (COSTAR), en RPMI al 5% de suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO) y mantenidas en una incubadora (Scientific) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda a punto de rocío, durante 3 o 5 días en promedio, dependiendo de la densidad inicial.

Para los ensayos experimentales, las células se sembraron en placas de 96 pozos (Nunc, Dinamarca) a una densidad inicial de 1,500 células por pozo en 100 µL de medio como ya se indicó. Los tratamientos se realizaron por triplicado agregando diferentes concentraciones de ceramida C8 (Matreya y Biomol, USA) solubilizada en etanol absoluto (SIGMA). Los controles utilizados fueron cultivos que no se estimularon con C8 y a los que se les agregó etanol. Las células fueron incubadas durante 48 horas y posteriormente se evaluó la proliferación por los métodos que se describen a continuación.

## **Incorporación del Colorante Cristal Violeta para la Determinación de la Proliferación Celular.**

Uno de los métodos utilizados para evaluar la proliferación celular fue la técnica de incorporación del colorante cristal violeta a los núcleos celulares (Kueng et al, 1989). Esta técnica consistió en sembrar y estimular a las células en las mismas condiciones de cultivo que se mencionaron. Transcurrido el tiempo de estímulo, las células fueron fijadas durante 10 minutos con glutaraldehído al 1.1% en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (SIGMA), y posteriormente lavadas y secadas al aire. Se añadieron 50  $\mu$ l/pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico (SIGMA) pH 6.0 y se mantuvo durante 10 minutos en agitación constante. Después de la tinción, se lavaron tres veces las cajas de cultivo con agua desionizada o bidestilada, de tal manera que el colorante no asimilado fue retirado de los pozos. Posteriormente se añadieron 50  $\mu$ l de ácido acético al 10% en SAF, dejando en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente para desteñir a las células y que el colorante quedara en suspensión de forma homogénea. Posterior a eso, se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA (EL800; Bio-Tek) a 570 nm, y las densidades ópticas se graficaron como % de proliferación celular con respecto al control.

## **Evaluación de la Actividad Metabólica de las Células por la Reducción de MTT.**

Esta técnica utiliza como principio la reducción de la sal de tetrazolio, 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5, bromuro difeniltetrazolio en la mitocondria de la célula, para producir un compuesto insoluble de color azul llamado formazán, que nos mide la actividad mitocondrial de las células (Green et al, 1984) (Ver apéndice). La cantidad de sal reducida medida espectrofotométricamente, es directamente proporcional al número celular. Las células fueron cultivadas en presencia y ausencia de C8 y después de 48 h, se agregaron 40  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) (SIGMA) a cada pozo y fueron incubados durante 4 horas. Transcurrido el tiempo, el sobrenadante fue retirado y las células fueron lavadas



con SAF (para eliminar el MTT no asimilado). Después se añadieron 50 µl/pozo de isopropanol 0.1N de HCl para disolver el formazán, (el cual da una coloración azul), y su intensidad se cuantificó en un lector de placas a una longitud de onda dual de 570/630 nm. Las densidades ópticas se graficaron como % de la actividad mitocondrial con respecto al control.

### **Viabilidad Celular por el Método de Exclusión por Azul Tripano.**

El colorante azul tripano sólo es asimilado por la célula cuando ésta se encuentra deteriorada de la membrana (células muertas por necrosis), en cambio, las células que no incorporan el azul tripano, se consideran como células viables.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos en las condiciones que se mencionaron anteriormente; posteriormente fueron inducidas con C8, y transcurrido el tiempo de estímulo, el sobrenadante fue retirado de los pozos y se agregó tripsina para desprender a las células. Estas se diluyeron 1 a 1 con azul tripano. Las células se contaron en una cámara de Neubauer (Boeckel Co) y el porcentaje de viabilidad fue obtenido mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Células teñidas}}{\text{Células teñidas} + \text{Células no teñidas}} \times 100$$

### **Análisis Morfológico por Tinción de Núcleos con Giemsa.**

Cuando se requiere observar el núcleo celular, uno de los métodos más utilizados es la técnica de tinción de núcleos con Giemsa, en la cual, este colorante se incorpora al núcleo, permitiendo distinguir la morfología de la célula. La técnica de tinción con Giemsa-Wright consistió en cultivar las células sobre portaobjetos dentro de placas de 24 pozos con una densidad de 15,000 células por pozo y estimularlas como ya se ha mencionado. Cuando transcurrió el tiempo de estímulo con C8, las células fueron lavadas con SAF y se fijaron durante 5 minutos con metanol, retirándolo después y dejando secar al aire las placas. Posteriormente se añadió Giemsa-Wright (5mg/ml) (SIGMA), cubriendo la superficie de los cubreobjetos de 5-10 minutos, y las placas se lavaron con agua para retirar el exceso de colorante y se secaron al aire para después realizar las observaciones en el microscopio.

### **Análisis Morfológico por Tinción de núcleos con ioduro de propidio.**

Los núcleos teñidos por ésta técnica pueden mostrar el estado íntegro o fragmentado del DNA, la condensación nuclear y la formación de los cuerpos apoptóticos. Se sembraron  $7 \times 10^4$  células en platos de cultivo de 38 mm, los cuales contenían pequeños portaobjetos y 1.5 ml de medio; posterior a esto, se realizó la inducción con C8 y se incubó durante 48 horas. Se retiró después el sobrenadante de los platos y las células fueron lavadas con SAF y fijadas en frío con acetona absoluta durante 5 minutos; las células fueron lavadas con SAF, y se tiñeron con una solución de ioduro de propidio (2 mg/ml) (SIGMA) durante 1 ó 2 minutos. A partir de este momento, las células se protegieron de la luz y se lavaron tres veces con SAF y una vez con agua. Cuando las placas se secaron al aire, los cubreobjetos se colocaron en portaobjetos y éstos se observaron en el microscopio de fluorescencia (Zeiss, Olympus B071) con el objetivo seco fuerte 100X para observar las diferencias en morfología de las células tratadas con respecto a las no tratadas.

### **Incorporación de timidina tritiada.**

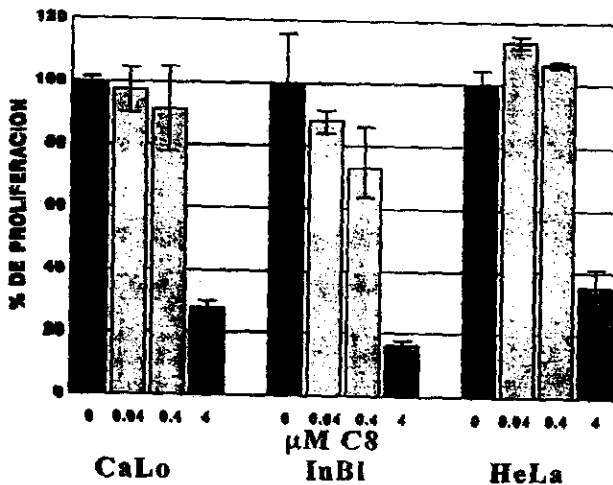
Cuando se realizan ensayos en los que se requiere dar un seguimiento a el contenido de ADN de una población celular, se recurre a la técnica de incorporación de timidina tritiada. Para cuantificar la síntesis de ADN, se utiliza uno de los elementos que lo conforman (específicamente la timidina, que es un análogo de la timina), que lleva una marca radiactiva (tritio) (Wright et al, 1992). Esta timidina se incorpora cuando ocurre la síntesis de ADN y esto nos permite estimar la cantidad de éste que se está sintetizando.

Se sembraron 30,000 células sincrónicas (privadas 24 h sin suero) en placas de 24 pozos con 500 µl de medio de cultivo, siendo éste el tiempo cero de cultivo. Se realizaron los estímulos con C8 a partir del tiempo 0 e incluyendo las 2, 4, 6 y 8 horas pulsadas con 0.1 µCi/ml de timidina tritiada (Amersham). Después de concluido el tiempo de cultivo, el medio con la timidina no incorporada fue retirado, las células fueron lavadas con SAF, fijadas con metanol al 95% en SAF durante 10 minutos, y los pozos se lavaron después 3 veces con una solución de SAF para eliminar los residuos de timidina tritiada que no se incorporó. Posteriormente se agregaron a cada pozo 500 µl de NaOH 800 mM durante 6 h para lisar a las células. El lisado celular contenido en el hidróxido fue resuspendido y colectado en viales previamente preparados, conteniendo 3 ml de líquido de centelleo (BECKMAN, USA), y posteriormente fueron leídos en un contador de centelleo (Beckman). Las cuentas por minuto (CPM) obtenidas fueron graficadas como % de CPM con respecto al control.

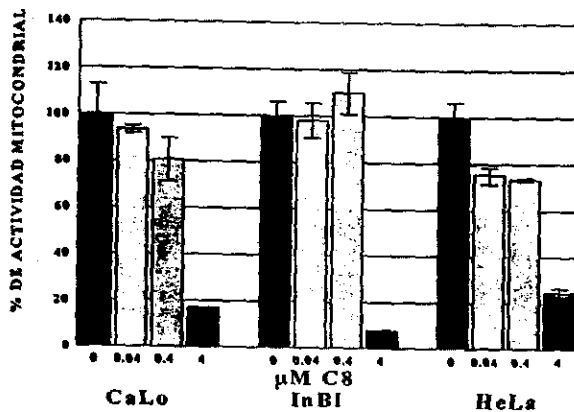
## RESULTADOS

**La ceramida inhibe la proliferación y la actividad metabólica de líneas celulares tumorales.**

Para determinar el efecto de la ceramida en la proliferación de células tumorales de cérvix, se cultivaron las líneas CaLo, InBl y HeLa en presencia de diferentes concentraciones de ceramida (C8), y se evaluó la proliferación, la viabilidad y la actividad metabólica a los dos días de estímulo. Las concentraciones de 40, 80 y 120  $\mu\text{M}$ , afectaron considerablemente todas las actividades evaluadas en las tres líneas, demostrando que la C8 a tales concentraciones, es altamente tóxica. En consecuencia, se utilizaron concentraciones de 0.04, 0.4 y 4  $\mu\text{M}$ ; y se midió la proliferación y la viabilidad de las tres líneas por medio de las técnicas de cristal violeta y exclusión por azul tripano, respectivamente. En la gráfica 1, se observa que la proliferación de las tres líneas tumorales a 4  $\mu\text{M}$ , es menor al 40% (con respecto al control sin C8), en cambio, a 0.04 y 0.4  $\mu\text{M}$ , la proliferación no es inhibida; mientras que en las células HeLa, se observó inhibición a todas las concentraciones utilizadas. Como control, se utilizaron células a las que se les agregó etanol, ya que éste es el vehículo en donde la ceramida es disuelta.



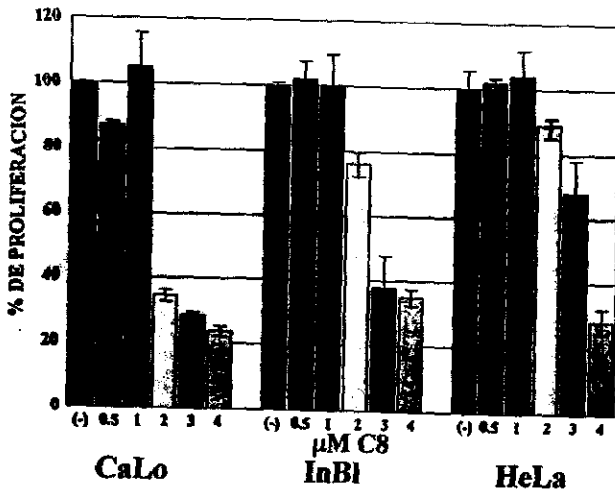
Gráfica 1. Efecto de la C8 en la proliferación de las líneas CaLo, InBI y HeLa a diferentes concentraciones. Se utilizaron cultivos en fase exponencial y sembrados en placas de 96 pozos. La evaluación se realizó a los dos días por medio de la incorporación de cristal violeta. Se observa que a 4µM de la C8 las tres líneas presentan el menor % de proliferación. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.



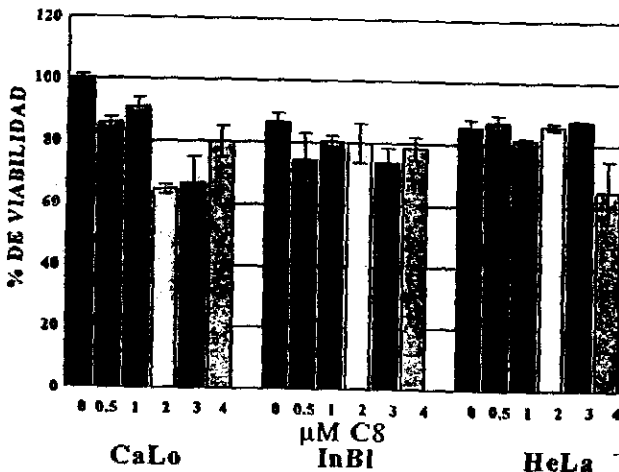
Gráfica 2. Efecto de la C8 sobre la reducción de MTT en las tres líneas celulares. Se utilizaron cultivos en fase exponencial y las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. La evaluación se realizó a los dos días de estimular con 0.04, 0.4 y 4 µM de C8. Se observa que 4 µM las tres líneas reducen alrededor de un 20 % la actividad mitocondrial. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.

Por otro lado, se evaluó la actividad mitocondrial de las células tratadas a 0.04 , 0.4 y 4  $\mu\text{M}$  por medio de la reducción del MTT. Los resultados muestran que en las células tumorales con 4  $\mu\text{M}$  de C8, la actividad mitocondrial es inhibida entre un 75 y un 90%, mientras que a las concentraciones de 0.04 y 0.4  $\mu\text{M}$ , las tres líneas celulares presentaron una actividad mitocondrial mayor al 70% (Gráfica 2).

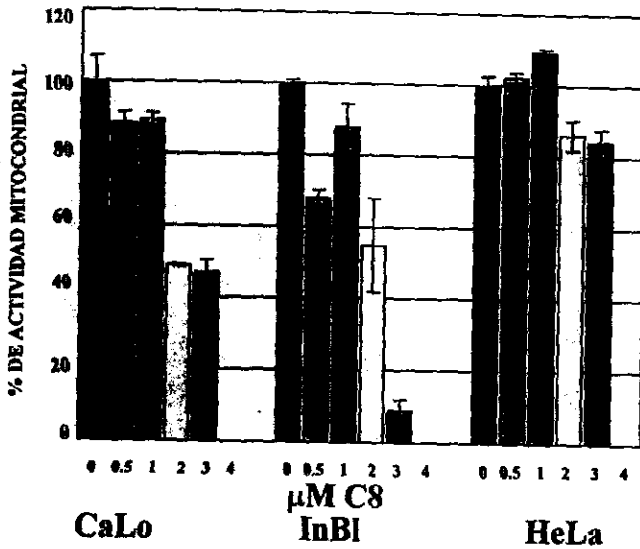
Debido a que se observó una notable inhibición de la proliferación a concentraciones de 4  $\mu\text{M}$  de C8, y que el efecto fue mínimo a la concentración de 0.4  $\mu\text{M}$ , se utilizaron concentraciones en el rango de 0.4 y 4  $\mu\text{M}$ . En la gráfica 3 se muestra la proliferación de las células tumorales tratadas a 0.5, 1, 2, 3 y 4  $\mu\text{M}$ . Se observa que a 3  $\mu\text{M}$ , se disminuyó en un 70% la proliferación de las células CaLo, en un 62% para InBI y para HeLa un 32%. A esta concentración, las células CaLo se mostraron más sensibles al efecto inhibitorio de la C8 presentando un 67% de viabilidad, y la línea HeLa fue la más resistente, ya que presentó un 88% de viabilidad (Gráfica 4). Se puede observar, que las células que mostraron mayor inhibición de la proliferación causada por la C8, también presentaron una menor viabilidad y viceversa. La actividad mitocondrial para 3  $\mu\text{M}$  de C8 fue variable entre las tres líneas, presentándose en la línea CaLo un 50%, para las HeLa un 83% y para las InBI se presentó el menor porcentaje de actividad mitocondrial siendo de un 10%. Aunque la línea celular más sensible a la inhibición de la proliferación fue la línea CaLo, la línea InBI presentó el menor % de actividad metabólica. Cabe mencionar que a concentraciones de 0.5 y 1  $\mu\text{M}$ , la actividad mitocondrial fue mayor al 70% con respecto al control (Gráfica 5).



Gráfica 3. Efecto de la ceramida a concentraciones de 0.5 hasta 4  $\mu\text{M}$  en las tres líneas celulares. Se utilizaron cultivos en fase exponencial y las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. La evaluación de la proliferación se realizó 2 días después del estímulo por medio de la incorporación de cristal violeta. Se observa que a 3  $\mu\text{M}$  de C8, las líneas CaLo e InBI presentan una proliferación menor al 40 %, en cambio HeLa mostró ser la más resistente hasta 3  $\mu\text{M}$ . Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.



Gráfica 4. Viabilidad celular de las tres líneas tratadas con ceramida desde 0.5 hasta 4  $\mu\text{M}$ . Se utilizaron cultivos en fase exponencial y las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. La evaluación se realizó dos días después del estímulo por medio de exclusión de azul tripano. Se observa que la viabilidad de las tres líneas fue variable, pero mayor al 67% en las tres líneas.

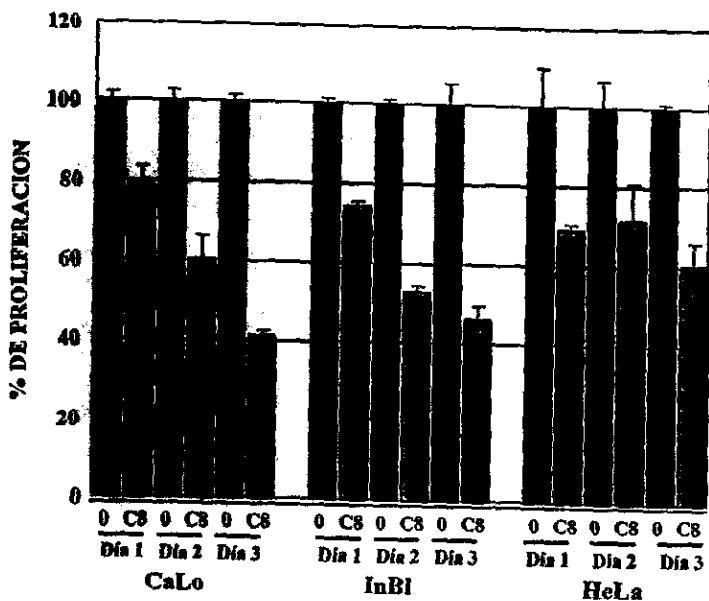


Gráfica 5. Efecto de la ceramida C8 sobre la actividad mitocondrial de las tres líneas tratadas con ceramida desde 0.5 hasta 4  $\mu\text{M}$ . Se utilizaron cultivos en fase exponencial y las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. La evaluación se realizó dos días después del estímulo por medio de la reducción de MTT. Se observa que la línea HeLa es la más resistente al efecto inhibitorio de la C8 excepto a 4  $\mu\text{M}$ , que es la concentración a la cual no se registra actividad mitocondrial en las tres líneas. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.

### El efecto antiproliferativo de la C8 es tiempo-dependiente.

Para determinar si el efecto de la ceramida era dependiente del tiempo en las tres líneas celulares, se realizó una curva en el tiempo utilizando 3  $\mu\text{M}$  de C8, y se evaluó la proliferación cada 24 horas durante tres días. Los resultados muestran que la ceramida disminuye la proliferación celular a través del tiempo, ya que se observó una disminución de la proliferación celular en las tres líneas utilizadas a partir del primer día de cultivo, siendo mayor la inhibición al segundo y tercer día (Gráfica 6). La inhibición de la proliferación fue variable en las tres líneas, pero la línea celular HeLa se mostró más resistente como en las evaluaciones anteriores ante la inhibición por la presencia de la C8 en el tiempo.



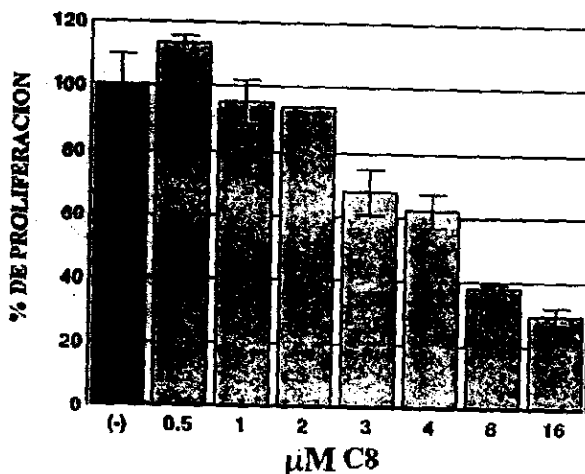


Gráfica 6. Efecto de la ceramida C8 a 3  $\mu$ M sobre la proliferación evaluada a diferentes tiempos para las tres líneas. Se utilizaron cultivos en fase exponencial y las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. La evaluación se realizó por medio de tinción con cristal violeta. Se observa la disminución de la proliferación a partir del primer día. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.

**La ceramida inhibe la proliferación de células epiteliales, fibroblastos y endotelios normales a una mayor concentración que para las células tumorales.**

Debido a que se observó un efecto inhibitor de la C8 sobre la proliferación de las líneas celulares tumorales, se investigó su efecto sobre la proliferación de células epiteliales normales provenientes de cérvix humano (ya que las células tumorales tienen el mismo origen), y en fibroblastos (que forman parte del microambiente del cérvix); así como en endotelios normales (que son epitelios modificados que recubren la vasculatura de los tejidos). Para ello, se utilizaron cultivos celulares provenientes de cérvix de histerectomías y células endoteliales de cordón umbilical humano (ver apéndice) con diferentes concentraciones de C8. En la gráfica 7 se observa, que las células epiteliales

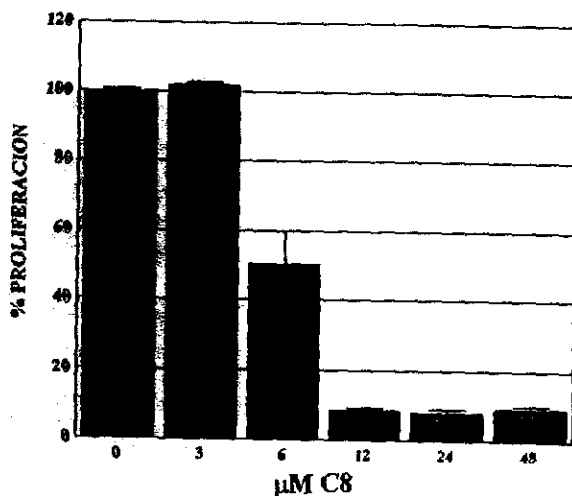
normales, no presentaron inhibición de la proliferación a 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  de C8, mientras que a 3  $\mu\text{M}$  presentaron una inhibición del 30%. La inhibición de la proliferación fue notable a concentraciones mayores, obteniéndose una inhibición de un 60% a 8  $\mu\text{M}$  y un 70% a 16  $\mu\text{M}$ . Cabe destacar que a 3  $\mu\text{M}$ , la inhibición en la proliferación de las células tumorales CaLo e InBl, fue mayor con respecto a la de células epiteliales normales a esta misma concentración; en cambio en las Hela, se presentó el mismo porcentaje de inhibición a 3  $\mu\text{M}$  con respecto a las normales; pero a 4  $\mu\text{M}$ , la diferencia de inhibición fue de un 34% entre normales y tumorales (Gráfica 3), siendo más resistentes a la C8 los epitelios normales.



Gráfica 7. Efecto de la C8 en la proliferación de epitelios normales de cérvix desde 0.5 hasta 16  $\mu\text{M}$ . Se utilizaron cultivos en fase exponencial y las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. La evaluación se realizó tres días después del estímulo por medio de incorporación de cristal violeta. Se observa que estas células se comportan de forma dosis-dependiente pero son más resistentes que las tumorales al efecto de la C8. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.

La curva dosis-respuesta de células endoteliales (CEs) en presencia de diferentes concentraciones de ceramida nos muestra que a la concentración de 3  $\mu\text{M}$ ,

(concentración a la cual provoca inhibición de la proliferación de las células tumorales), la ceramida no tiene ningún efecto con respecto a las células que no fueron tratadas, pero a concentraciones de 6  $\mu\text{M}$ , las células presentan alrededor de un 50% de proliferación, y un 10% de proliferación cuando las concentraciones aumentan a 12, 24 y 48  $\mu\text{M}$  (Gráfica 8). Es importante resaltar que en las células tumorales, a partir de la concentración de 4  $\mu\text{M}$  se presentó una inhibición alrededor de un 60 y 70% (Gráfica 3).

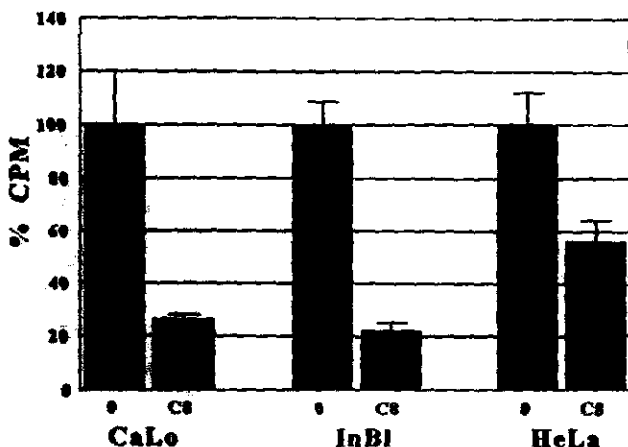


Gráfica 8. Efecto de la ceramida a diferentes concentraciones en la proliferación de endotelios normales de cordón umbilical humano (CEs). Se utilizaron cultivos en fase exponencial y las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. La evaluación se realizó dos días después del estímulo por medio de incorporación de cristal violeta. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.

### **La ceramida inhibe la síntesis del ADN en las células tumorales de cérvix.**

Con la finalidad de determinar si el efecto antiproliferativo de la C8 se asocia con una inhibición de la síntesis del ADN y con un posible paro del ciclo celular, deteniendo a las células en la fase G1 y evitando la transición a S, se evaluó la síntesis de ADN por medio de la incorporación de timidina tritiada. Las tres líneas celulares fueron tratadas con 3  $\mu\text{M}$  de C8 y se evaluó la incorporación de timidina a los dos días después del estímulo. Se puede observar que la C8 bloqueó la síntesis de ADN en las tres líneas

celulares tratadas con respecto a la síntesis que presentaron las células no tratadas. Las células CaLo e InBI, incorporaron alrededor de un 26 y un 22%, respectivamente; mientras que las células HeLa presentaron una mayor incorporación (55%). Los resultados demuestran que la C8 es capaz de bloquear la síntesis del ADN de las células tumorales, deteniéndolas en la fase G1 y evitando la transición a S (Gráfica 9).

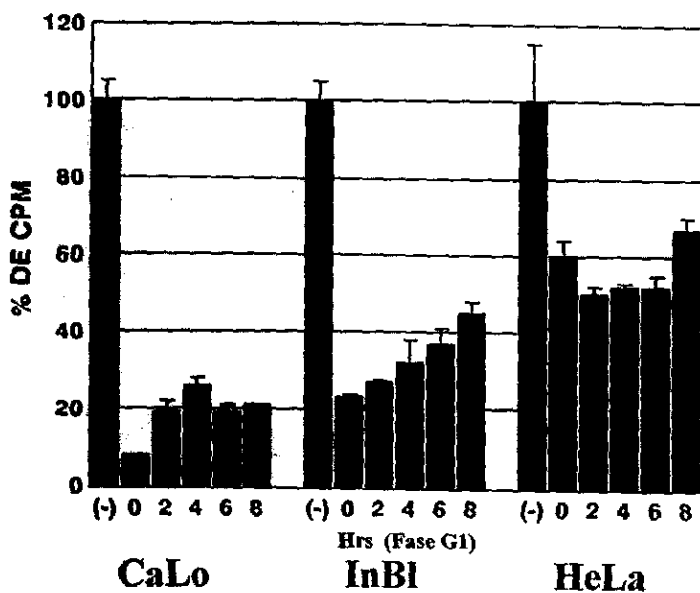


Gráfica 9. Efecto de la ceramida en la síntesis del ADN en las células tumorales de cérvix. Se utilizaron cultivos en fase exponencial sembrados en placas de 24 pozos con  $3 \mu\text{M}$  de C8. Las células fueron pulsadas con  $0.1 \mu\text{Ci/ml}$  de timidina tritiada al inicio del cultivo y fueron evaluadas dos días después del estímulo. La incorporación de timidina tritiada fue graficada como el porcentaje de cuentas por minuto (CPM). Se observa que la C8 inhibe la síntesis de ADN en las tres líneas celulares, siendo las HeLa las más resistentes. 0= control, C8= células tratadas con C8. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.

**El efecto inhibitor de la ceramida se lleva a cabo en la fase G1 del ciclo celular.**

Para evaluar si el efecto antiproliferativo de la ceramida se lleva a cabo en la fase G1 del ciclo celular, como se ha descrito para la mayoría de los factores inhibidores de la proliferación por varios autores, (Pardee et al, 1989; Edson et al, 1991; Poliak et al, 1996), se cultivaron células tumorales realizando pulsos de  $3 \mu\text{M}$  de C8 en diferentes puntos de la fase G1 del ciclo (la cual tiene una duración de 8 horas aproximadamente), y se evaluó la incorporación de timidina tritiada a las 30 horas de cultivo (tiempo que tardan en completar un ciclo celular). Los resultados muestran que cuando la C8 fue

agregada a la hora cero de cultivo, y permaneció durante 30 horas, se presentó una fuerte inhibición de la síntesis del ADN en las tres líneas celulares; presentándose una síntesis menor al 10% en las células CaLo, un 23% en las células InBI y un 60% en las células HeLa (Gráfica 10). También se observa que el efecto inhibitorio en la incorporación de timidina tritiada, se va perdiendo en cuanto la C8 es adicionada en un punto más cercano a la transición con la fase de síntesis (S) del ciclo celular. Cabe mencionar que las células que incorporaron una menor cantidad de timidina, fueron las células CaLo, mientras que las células HeLa fueron las que presentaron una mayor síntesis del ADN con respecto a las otras dos líneas, tales datos concuerdan con los obtenidos para la proliferación celular. Estos resultados demuestran que la C8 ejerce su efecto antiproliferativo en toda la fase G1, evitando que las células transiten a la fase S.



Gráfica 10. Efecto de la ceramida en la fase G1 del ciclo celular (de duración de 8 horas) en las tres líneas celulares. Las células fueron tratadas con  $3 \mu\text{M}$  de C8 cada dos horas a lo largo de la fase G1 y se evaluó la síntesis de ADN después de 30 horas (tiempo que dura un ciclo) por medio de la incorporación de timidina tritiada. Se observa que la síntesis de ADN de las tres líneas celulares es bloqueada por la C8 a partir de la hora 0, y que el efecto se va perdiendo conforme las células transitan a S. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar de un ensayo representativo.

**La ceramida no induce apoptosis a las concentraciones que inhibe la proliferación en las células tumorales.**

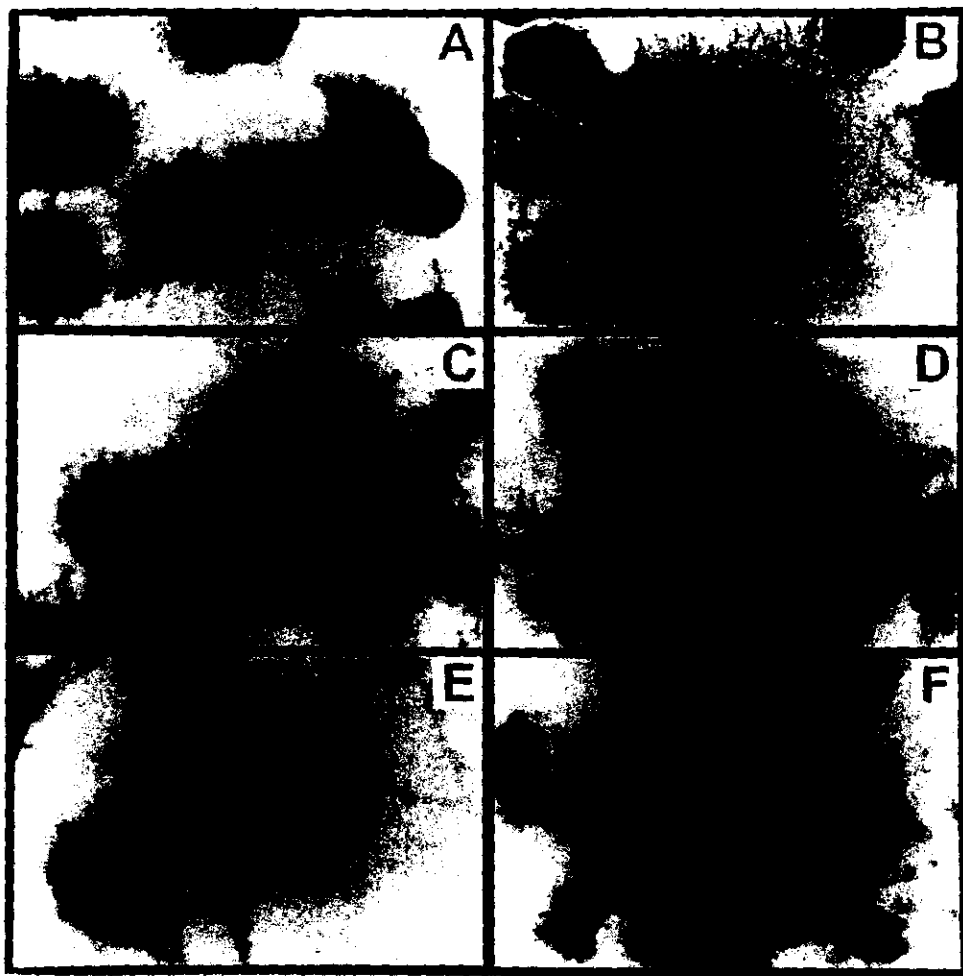
Se ha descrito, que uno de los principales efectos biológicos inducidos por la ceramida, es la muerte celular apoptótica (Shellhaas et al, 1995; Ji et al, 1995). Para determinar si el efecto antiproliferativo de la ceramida se asocia a la apoptosis, se extrajo el ADN de las tres líneas celulares tratadas y no tratadas con C8 a los dos días de estímulo, y se realizaron corrimientos en geles de agarosa al 1% de las muestras correspondientes a cada condición, con el fin de determinar la fragmentación del ADN que caracteriza a la apoptosis. (Ji et al, 1995). En las células tratadas con C8 no se observó fragmentación de ADN, y no se presentó la escalera típica de la muerte. Para determinar si se formaban cuerpos apoptóticos como otra característica de la apoptosis, los núcleos de las células fueron teñidos con yoduro de propidio, el cual es un colorante fluorescente que se incorpora al ADN, y se observó que las células con C8 no formaban cuerpos apoptóticos como consecuencia de la condensación del ADN (datos no mostrados). En este caso, bajo las condiciones de estudio, la C8 no desencadena muerte celular programada, al igual que lo observado para la escalera de la muerte (datos no mostrados).

### **La ceramida induce cambios morfológicos en las células tumorales de cérvix.**

Para determinar si la ceramida induce cambios morfológicos en las células tumorales de cérvix, se realizaron tinciones con Giemsa-Wright. Las imágenes de la figura 5 muestran que en las células CaLo tratadas con C8 (figura 5B), la cantidad de citoplasma es menor con respecto a las células control (figura 5A), además se observa que el núcleo y el ADN de las células con C8, presentan una condensación; por otro lado, los núcleos no compactados contienen una gran cantidad de vacuolas, en comparación con las células no tratadas, las cuales presentaron una tinción homogénea del núcleo.

Las células InB1 con C8 presentaron una menor cantidad de citoplasma y el ADN sufrió una condensación (Figura 5D), observándose la tinción más intensa en algunas partes, y el núcleo más pequeño que el de las células no tratadas (al igual que sucedió con las células CaLo con ceramida) (Figura 5C). Todas las células tratadas con C8 presentaron una tinción más homogénea, lo que nos da una idea del estado en que se encuentra el material nuclear. Algunas células con C8 presentaron un tamaño superior al de las células control, como se observa en la figura 5D.

En las células HeLa, la C8 indujo cambios morfológicos nucleares y citoplasmáticos. En la figura 5E se muestra que la ceramida provocó una disminución de la cantidad de citoplasma y el tamaño del núcleo (condensación del ADN), éstas características se presentaron en las células que no fueron tratadas con ceramida (figura 5D). Así mismo, se observa que el citoplasma presentó una gran cantidad de vesículas y vacuolas, siendo un número menor al que se presenta en las células CaLo e InB1 tratadas con C8.



**FIGURA 5.** Cambios morfológicos en las líneas CaLo, InBl y HeLa tratadas con ceramida a 4  $\mu$ M durante dos días. A. CaLo control. B. CaLo con ceramida. C. InBl control. D. InBl con ceramida. E. HeLa control. F. HeLa con ceramida. Las células fueron teñidas con el colorante Giemsa Wright.



Los cambios morfológicos se resumen en la tabla siguiente:

	CaLo	InBl	HeLa
<b>Citoplasma</b>	Disminución de la cantidad de citoplasma en las células respecto a las no tratadas con C8.		
<b>Núcleo</b>	El núcleo y el material nuclear (ADN) de las células tratadas con C8 presentaron una condensación, y en otros casos, el tamaño se observa superior al de el control.		
<b>Características</b>	Los núcleos presentan una vacuolización con respecto a las que no se trataron		Se presentan una gran cantidad de vesículas y una vacuolización en células tratadas.

Tabla 2. Cambios morfológicos que presentan las células tratadas con C8 con respecto a las no tratadas

Como se mostró en el recuadro anterior, la C8 es capaz de inducir cambios morfológicos parecidos a los de la apoptosis en las células tumorales de cérvix; sin embargo, las células estimuladas con ceramida no presentaron apoptosis. Probablemente se esté induciendo otro tipo de muerte celular, que se pudiera estar presentando a largo plazo.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Ha sido descrito para diferentes tipos celulares, que la ceramida participa como un segundo mensajero para producir el paro del ciclo celular o la apoptosis. Pese a los trabajos que se han realizado, el efecto de la ceramida en células de CaCu no ha sido estudiado. Por ello, uno de los objetivos principales de este estudio consistió en evaluar el efecto que ejerce la ceramida sobre la proliferación de las células provenientes de cáncer de cérvix CaLo, InBl y HeLa.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la ceramida es capaz de inhibir la proliferación de las líneas tumorales CaLo, InBl y HeLa. Esta inhibición aumenta conforme a la concentración, y el efecto desaparece cuando la concentración disminuye, por lo que podemos decir que el efecto de la ceramida es dosis-dependiente. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Ghassan y colaboradores (1995), en donde las células leucémicas MOLT-4 tratadas con diferentes concentraciones de ceramida desde 1 hasta 20  $\mu\text{M}$ , presentan una inhibición de manera dosis-dependiente. Cabe mencionar que de las tres líneas celulares de CaCu utilizadas, la que se mostró más sensible al efecto inhibitorio de la ceramida fue la línea CaLo, y de manera contraria, la línea celular que mostró más resistencia a la ceramida fue la línea HeLa; es probable que la sensibilidad al efecto antiproliferativo de la ceramida, pueda estar asociado al estado de transformación de dichas células, ya que pudieran estarse activando mecanismos de escape para tener una mayor sobrevivencia. La línea celular HeLa se deriva de un tumor metastásico de estadio IV B, que pudo haberse transformado aún más desde que fue obtenida; a diferencia de la línea CaLo (obtenida de una paciente con estadio II B), que es un estadio más temprano, no metastásico y que quizá pudiera conservar características parecidas a las células del tejido que le dieron origen. La línea celular InBl (estadio IV A no metastásico), se encuentra en un estadio más avanzado que las CaLo, pero menor al que caracteriza a las HeLa, y el efecto antiproliferativo que la ceramida ejerció sobre las InBl, se ubica entre el observado para las otras dos líneas estudiadas. Esto nos hace pensar que la sensibilidad

al efecto inhibitor de la ceramida C8, se va perdiendo conforme es más avanzado el estadio de malignidad del tumor; como lo que ha sido reportado con otros agentes inhibidores de la proliferación para los tratamientos del CaCu, en donde la respuesta de las pacientes con cáncer sometidas a una misma terapia, es más satisfactoria cuando el tumor se encuentra en estadios tempranos y se tiene un mejor control del cáncer (Krebs, 1992).

La inhibición de la proliferación inducida por la ceramida a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  en todas las células tumorales de cérvix, se asoció a una alta viabilidad. La supresión del crecimiento celular de la ceramida, se ha observado también en células derivadas de cáncer de páncreas, e inclusive en fibroblastos 3T3 (Nakabo et al, 1997). Para células hematopoyéticas, como en las células gliales C6, la ceramida causa el mismo efecto inhibitor observado en nuestras tres líneas tumorales (Dobrowski et al, 1994). En trabajos descritos por Jadayev y colaboradores (1995), se encontró que la ceramida sintética produce una fuerte inhibición de la proliferación en las células leucémicas MOLT-4; otros autores como Xu Jan y colaboradores (1998) mostraron que la ceramida C2 provoca muerte de forma dosis-dependiente en las células endoteliales cerebrales de bovino normales. Las concentraciones de ceramida utilizadas por otros autores para producir inhibición de la proliferación, son mayores a las utilizadas para inhibir la proliferación de las células tumorales en este trabajo; mostrando que las líneas utilizadas pueden ser más sensibles al efecto de la ceramida que otros tipos celulares.

Además del efecto inhibitor producido por la ceramida C8, también se observó que inhibió la actividad metabólica (mitocondrial) de las células al disminuir su capacidad para reducir el MTT. Esta reducción, puede estar correlacionada con el efecto inhibitor que se está presentando, ya que al disminuir la concentración de ceramida, la reducción de MTT aumenta, indicándonos que la ceramida de alguna forma interfiere con la actividad metabólica de las células estudiadas. La reducción de MTT, ha sido utilizada también como una medida de citotoxicidad (Green et al, 1984), ya que hay una correlación entre la disminución de actividad mitocondrial y el aumento de la citotoxicidad. Gómez y colaboradores (1996), demostraron que la

muerte celular inducida por el TNF- $\alpha$  en las células L-929, se correlaciona con un incremento en la reducción del MTT. La disminución en la capacidad de reducir el MTT en células tratadas con la ceramida C8, no se relaciona claramente con la pérdida de la viabilidad o con muerte celular encontrada en nuestro estudio, ya que se observó que puede existir una viabilidad alrededor del 70%, mientras que por otro lado, la actividad metabólica se reduce en un alto porcentaje. Aunque el efecto inhibitorio de la ceramida ha sido descrito por algunos autores, no ha sido evaluado el efecto que la ceramida pueda tener sobre la reducción del MTT en otros tipos celulares normales o tumorales.

En células epiteliales, fibroblastos de cérvix y en células endoteliales normales, observamos que la ceramida produce un efecto inhibitorio a concentraciones más altas en comparación a las que inhiben a las células tumorales; consideramos que esto es de gran importancia, ya que la ceramida pudiera ser utilizada como un tratamiento alternativo y local, en pacientes con CaCu, administrada en concentraciones que sólo afecten la proliferación de las células tumorales, sin perjudicar drásticamente a las normales. Sin embargo, para que la ceramida se utilice como un tratamiento en el futuro, se necesitan realizar otros estudios exhaustivos tanto *in vitro* como *in vivo*; utilizando algún modelo animal que presente algún tumor, o generando este mismo por medio de la inoculación de células tumorales y administrando posteriormente la ceramida. No se sabe hasta el momento, que la ceramida haya sido utilizada en la terapia de algún padecimiento oncológico.

También se pudo observar que el efecto antiproliferativo de la ceramida, se asocia a una disminución en la incorporación de timidina tritiada, lo que significa que la C8 induce un paro en el ciclo celular en la fase G1, evitando la transición a la fase S. Asimismo se determinó que el efecto de la ceramida se lleva a cabo en toda la fase G1 del ciclo celular, fase en la cual actúan la mayoría de los factores inhibidores de la proliferación (Pardee et al, 1989; Edson et al, 1991; Poliak et al, 1996). Así se muestra que la inhibición de la proliferación se realiza a través de un paro del ciclo celular; lo que coincide con el efecto observado por Jadayev y colaboradores (1995), en las células MOLT-4 al ser tratadas con ceramida C2. En esas células leucémicas se lleva a cabo el paro del ciclo celular paralelamente con una desfosforilación de la proteína Rb,

que se presenta de una forma dosis-dependiente. Es probable que dentro de los eventos moleculares que están involucrados en la inhibición de la proliferación celular efectuada por la ceramida, se encuentren afectadas principalmente las proteínas Rb (retinoblastoma) y p53, las cuales participan como importantes frenos en la regulación de la progresión del ciclo celular, o moléculas involucradas indirectamente en la inhibición del crecimiento celular, como p21. Por esta razón, se recomienda realizar trabajos más a fondo que involucren técnicas moleculares más específicas que determinen el estado de fosforilación de la proteína Rb, de la cual se tienen evidencias de su participación en el efecto antiproliferativo mediado por ceramida en varias líneas celulares (McConkey et al, 1996); así como la expresión de la proteína p53, que se encuentra sobreexpresada en la mayoría de las células tumorales (Cao et al, 1997). Así mismo sería interesante determinar la participación de otras proteínas relacionadas con el control del ciclo celular como lo son las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los inhibidores de las CDKs, que pueden participar en la vía de señalización de la C8.

Por otro lado, se determinó que el paro en el ciclo celular inducido por la ceramida no se asocia con la muerte celular apoptótica, la cual fue evaluada por geles de agarosa para observar la fragmentación del ADN y la tinción nuclear para observar la aparición de los cuerpos apoptóticos; aunque se recomienda realizar otros ensayos como la tinción de núcleos por TUNEL y la citometría de flujo para observar si hay algún evento apoptótico observado con estas técnicas más específicas. Nosotros observamos que la C8 disminuye la viabilidad celular a altas concentraciones; esta pérdida en la viabilidad se podría estar relacionando con otro tipo de muerte celular diferente a la apoptosis, ya que al evaluar la morfología celular, se observó que la ceramida inducía cambios morfológicos en el núcleo y en el citoplasma en las tres líneas celulares tumorales cuando se tiñeron con Giemsa-Wright. Estos resultados coinciden con los cambios morfológicos observados en células de carcinoma de vejiga tratados con ceramida C6 (McConkey et al, 1996) y en la línea celular U-937 (Jarvis et al, 1994). Probablemente, los cambios en morfología observados en las células CaLo, InBl y HeLa tratadas con ceramida, pudieran estar asociados con eventos tardíos de la muerte celular. Sería de interés determinar si la ceramida puede inducir muerte celular

a largo plazo, como es el caso de la necrosis.

En resumen el presente estudio demostró lo siguiente:

- 1) que la C8 ceramida tiene un efecto antiproliferativo en células tumorales provenientes de *cérvix humano*, y que a las concentraciones que inhibe a éstas, no inhibe a células epiteliales, fibroblastos y endotelios normales humanos,
- 2) que este efecto antiproliferativo se asocia con una inhibición de la síntesis de ADN y por lo tanto, induce un paro del ciclo celular, y
- 3) que la C8 induce cambios morfológicos en las células tumorales sin inducir apoptosis.

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo siguiente:

La C8 inhibe la proliferación de las células CaLo, InBl y HeLa de una forma dosis y tiempo-dependiente; siendo la línea celular CaLo la más sensible al tratamiento y la línea HeLa la más resistente.

La C8 disminuye la actividad mitocondrial de las tres líneas celulares.

La C8 inhibe la síntesis de ADN, actúa en la fase G1 del ciclo celular y evita que las células transiten a la fase S.

La C8 no induce apoptosis en las células tumorales a las concentraciones que inhibe la proliferación, pero induce cambios morfológicos en el citoplasma y en el núcleo.

Las concentraciones de C8 que producen inhibición en las células tumorales, no afectan de igual manera la proliferación de células epiteliales normales de cérvix y de células endoteliales normales, por lo que la ceramida pudiera utilizarse a futuro como un tratamiento para las pacientes con cáncer cérvico-uterino.

## BIBLIOGRAFIA

Abe A, Radin NS, Shayman JA, Wotring LL, Zipkin RE, Sivakumar R, Ruggieri JM, Carson KG, Ganem B. (1995). Structural and Stereochemical Studies of Potent Inhibitors of Glucosylceramide Synthase and Tumor Cell Growth. *J. Lipid. Res. Mar*; 36: 611-21.

Adam D, Wiegmann K, Adamm-Klages S Ruff A, Kronke M. (1996). *J. Biol. Chem.* 271: 14617-14622.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Garland Publishing, Inc. New York & London.

Ariga T, Bhat S, Kanda T, Yamawaki M, Tai T, Kushi Y, Kasama T, Handa S, Yu RK. (1996). Expression and Localization of Lawis(x) Glycolipids and GD1 a Ganglioside in Human Glioma Cells. *Glycoconj. J.* 13: 135-45.

Ballou L, Chao C, Honless M, Barker S, Raghov R. (1992). Interleukin-1-mediated PGE2 production and sphingomyelin metabolism. Evidence of regulation of cyclooxygenase gene expression by sphingosine and ceramide. *J. Biol. Chem.* 267: 20044-20050.

Battaieb A, Record M, Come MG, Bras AC, Chap H, Laurent G, Jaffrezou JP. (1996). Opposite Effects of Tumor Necrosis Factor alpha on the Sphingomyelin-Ceramide Pathway in two Myeloid Leucemic Cell Lines: Role of Transverse Sphingomyelin Distribution in the Plasma Membrane. *Blood.* 88: 1465-72.

Bielawska A, Linaudic CM, Hannun YA. (1992). Modulation of Cell Growth and Differentiation by Ceramide. *FEBS. Lett.* 307: 211-4.

Bielawska AE, Shapiro JP, Jiang L, Melkonyan HS, Piot C, Wolfe CL, Tomei D, Hannun YH, Umansky SR. (1997). Ceramide is Involved in Triggering of Cardiomyocyte Apoptosis Induced by Ischemia and Reperfusion. *The Am. J. of Pathol.* 151:1257-1263.

Bielawska A, Greenberg M.S, Perry D, Jayadev S, Shayman JA, McKay C, Hannun YA. (1996). (1S,2R)-Derythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an Inhibitor of Ceramidase. *J. Biol. Chem.* 271: 12646-54.

Bielawska A, Crane HM, Liotta D, Obeid LM, Hannun YA. (1993). Selectivity of Ceramide-mediated Biology. Lack of activity of erythro-dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* 268: 26226-32.

Bird TA, Kyriakis JM, Tyshler L, Gayle M, Milne A, Virca GD. (1994). Interleukin 1 Activates p54 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase/stress- activated Protein Kinase



by a Pathway that is Independent of p21ras, Raf1, and Map Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.* 269: 31836-44.

Blenis J. (1993). Signal Transduction Via the MAP kinases: Proceed at Your Own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 5889-5892.

Bruce Alberts, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Watson D. James. (1990). *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1232 pp.

Buehrer, BM, Bell RM. (1992). Inhibition of Sphingosine kinase and Platelets. Implications for Signal Transductions Pathways. *J. Biol. Chem.* 267:3154.

Cai Z, Bettaieb A, Mahdani N E, Legres L G, Stancou R, Maslah J, Chouaib S. (1997). Alteration of the Sphingomyelin/ceramide Pathway is Associated with Resistance of Human Breast Carcinoma MCF Cells to Tumor Necrosis Factor-alpha-mediated Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 272: 6918-26.

Cao Yu-an, Gao Qingshen, Wazer David E, Band Vimia. (1997). Abrogation of Wild-type p53-mediated Transactivation is Insufficient for Mutant p53-induced Immortalization of Normal Human Mammary Epithelial Cells. *Can. Res.* 57: 5584-5589.

Chan M, Quintans J, Fuks Z, Thompson C, Kufe DW, Weichselbaum RR. (1996). Suppression of Bcl-2 Messenger RNA Production may Mediate apoptosis after Ionizing Radiation, Tumor Necrosis Factor alpha, and Ceramide. *Cancer. Res.* 55:991-4.

Chatterjee S. (1993). Neutral Sphingomyelinase. *Adv. Lipid. Res.* 26:25-48.

Chimura S.J, Nodzenski E, Crane M.A, Virudachalam S, Hallahan D.E, Weichelbaum R.R, Quintans J. (1996). Cross Talk between Ceramide and PKC Activity in the Control of Apoptosis in WEHI-231. *J. Adv. Exp. Med. Biol.* 406: 39-55.

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. (1996). FADD/MORT1 is a Common Mediator of CD95 (Fas/APO-1) and Tumor Necrosis Factor Receptor-Induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 4961-5.

Cifone M.G, Roncaioli P, De Maria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G, Testi R. (1995). Multiple Pathways Originate at the Fas/APO-1 (CD95) Receptor Sequential Involvement of Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C and Acidic Sphingomyelinase in the Propagation of the Apoptotic Signal. *EMBO. J.* 14: 5859-68.

Clejan S, Dotson R.S, Wolf E.W, Corb M.P, Ide C.F.(1996). Morphological Differentiation of NIE-115 Neuroblastoma Cells by Dimethyl Sulfoxide Activation of Lipid Second Messenger. *Exp. Cell. Res.* 224: 16-27.

Das DV, Cook HW, Spence MW. (1984). Evidence that Neutral Sphingomyelinase of Cultured Murine Neuroblastoma Cells is Oriented Externally on the Plasma Membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* 777: 339-42.

Dbaiho G.S, Obeid LM, Hannun YA. (1993). Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) Signal Transduction through Ceramide. Dissociation of Growth Inhibitory Effects of TNF-alpha from Activation of Nuclear Factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* 268: 17762-6.

Dbaiho G.S, Pushkareva M.Y, Jadayev S, Shwartz J.K, Horowitz J.M, Obeid L.M, Hannun Y.A. (1995). Retinoblastoma Gene Product as a Downstream Target for a Ceramide-Dependent Pathway of Growth Arrest. *Proc. Natl. Aca. Sci.* 92:1347-51.

Dbaiho G.S, Perry D K, Gamard C J, Platt R, Poirier G G, Obeid L M, Hannun Y A. (1997). Cytokine Response Modifier A (CrmA) Inhibits Ceramide Formation in Response to Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha: CrmA and Bcl-2 Target Distinct Components in the Apoptotic Pathway. *J. Exp. Med.* 185: 481-90.

Dobrowsky R.T, Kamibayashi C, Mumby M.C, Hannun Y.A. (1993). Ceramide Activates Heterodimeric Protein Phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 268: 15523-30.

Dobrowsky R.T, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA. (1994). Activation of the Sphingomyelin Cycle through the Low-Affinity Neurotrophin Receptor. *Science.* 265: 1596-9.

Dressler, KA, Kolesnick RN.(1990). Ceramide 1-phosphate, a Novel Phospholipid in Human Leukemia (HL-60) Cells. *J. Biol. Chem.* 265:14917.

Dyatlovitskaya EV, Andreasyan GO, Malykh Ya N, Rylova SN, Somova OG.(1997). Ganglioside Shedding and Changes in Ceramide Biosynthesis in Human Ovarian Tumors. *Biochem. Mosc.* 62:557-61.

Edson GD, Gattaey H.K, Johnson TC. (1991). Cell Cycle Arrest and Cellular Differentiation Mediated by a Cell Surface Glycopeptide. *Life Sci.* 48: 1813.

Escandón RC, Benítez MM, Espinoza NJ, Vázquez MJ. (1992). Epidemiología del Cáncer Cervicouterino en el IMSS. 34(6): 607-14.

Field FJ, Chen H, Born E, Dixon B, Malthur S. (1993). Release of Ceramide after Membrane Sphingomyelin Hydrolysis Decreases the Basolateral Secretion of Triacylglycerol and Apolipo-Protein B in Cultured Human Intestinal Cells. *J. Clin. Invest.* 92: 2609-19.

Flamigni F, Faenza Y, Marmioli S, Stanic I, Giaccari A, Muscari C, Stefanelli C, Rossoni C. (1997). Inhibition of the Expression of Ornithine Decarboxylase and c-Myc

by Cell-Permeant Ceramide in Difluoromethylornithine-resistant Leukaemia Cells. *Biochem J.* 324: 783-9.

Gamen S, Anel A, Pi A, Naval J. (1998). Caspases are the Main Executioners of Fas-Mediated Apoptosis, Irrespective of the Ceramide Signalling Pathway. *Cell Death and Differ.* 5: 241-249.

García CA, Gariglio PV. (1993). Molecular Aspects of Human Papillomaviruses and their Relation to Uterine Cervix Cancer. *Rev. Invest. Clin.* 458: 85-92.

Geley S, Hartmann B L, Kofler R. (1997). Ceramides Induce a Form of Apoptosis in Human Acute Lymphoblastic Leukemia Cells that is Inhibited by Bcl-2, But no by CrmA. *FEBS Lett.* 400: 15-8.

Gill ZP, Perks CM, Newcomb PV. (1997). Insuline Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP-3) Predisposes Breast Cancer Cells Programmed Cell Death in a Non-IGF-Dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 272:25602-7.

Green Lora M, Reade LJ, Ware FC. (1984). Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines.

Goldkorn T, Dressler K.A, Muindi J, Randin N.S, Mendelsohn J, Menaldino D, Liotta D, Kolesnick R.N. (1991). Ceramide Estimulates Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation in A431 Human Epidermoid Carcinoma Cells. Evidence that Ceramide May Mediate Sphingosine Action. *J. Biol. Chem.* 266: 16092-7.

Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, Martin S, Nishioka W, Brunner T, Baier Bitterlich G, Byrd C, Lang F, et al. (1995). FAS-induced Apoptosis is Mediated Via a Ceramide-Initiated RAS Signaling Pathway. *Immun.* 2: 341-51.

Gulbins E, Welsh J, Lepple Wienhuis A, Heinle H, Lang F. (1997). Inhibition of Fas Induced Apoptotic Cell Death by Osmotic Cell Shrinkage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 (2):517-21.

Haimovitz FA, Kan CC, Ehleither D. (1994). Ionizing Acts on Cellular Membranes to Generate Ceramide and Initiate Apoptosis. *J.Exp.Med.* 180: 525-535.

Hannun Y.A., (1994). The Sphingomyelin Cycle and the Second Messenger Function of Ceramide *J. Biol Chem.* 269: 3125-3128.

Herrmann JL, Menter DG, Beham A, Eschenbach A, Mc Donnell T.J. (1997). Regulation of Lipid Signaling Pathways for Cell Survival and Apoptosis by Bcl-2 in Prostate Carcinoma Cells. *Exp. Cell. Res.* 234: 442-51.

Holleran WM, Feingold KR, Mao-Quiang M, Gao WN, Lee JM Elias PM. (1991). Regulation of Epidermal Sphingolipid Synthesis by Permeability Barrier Function. *J. Lipid. Res.* 32: 1151.

Ido M, Hayashi K, Kato S, Ogawa H, Komada Y, Zhou W.Y, Zhang X.L, Sakura M, Susuki K. (1996). Isolation and Characterisation of Kasumi-1 Human Myeloid Leukaemia Cell Line Resistant to Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Apoptosis. *Br. J. Cancer.* 73: 360-5.

Isakova LM, Hanina KP, Osins'Ka OV, Vinnyts'ka AB. (1995). *Tsitol. Genet. (Ukraine).* 2982: 54-60.

Jadayev S, Hayter H.L, Andriew N, Gamard C.J, Liu B, Balu R, Hayakawa M, Ito-F, Hannun Y.A. (1997). Phospholipase A2 is Necessary for Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Induced Ceramide Generation in L-929. *J. Biol.Chem.* 272: 17196-203.

Jafrezou JP, maestre N, de Mas-Mansat V, Bezombes C, levade T, Laurent G. (1998). Positive Feedback Control of Neutral Sphingoyelinase Activity by Ceramide. *FASEB J.* 12: 999-1006.

Jayadev S, Liu B, Bielawska A.E, Lee J.Y, Nazaire F, Pushkareva M.Y, Obeid L.M, Hannun Y.A. (1995). *J. Biol. Chem.* 270: 2047-2052.

Jayadev S, Linardic CM, Hannun YA. (1994). Identification of Arachidonic Acid as a Mediator of Sphingomyelin Hydrolysis in Response to Tumor Necrosis Factor alpha. *J. Biol. Chem.* 269: 5757-63.

Jarvis WD, Fornari FA Jr, Browning JL, Gerwitz DA, Kolesnick RN, Grant S. (1994). Attenuation of Ceramide-Induced Apoptosis by Diglyceride in Human Myeloid Leukemia Cells. *J. Biol. Chem.* 269: 31685-92.

Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari F, Traylor RS, Gewirtz D A, Grant S. (1994). Induction of Apoptotic DNA Damage and Cell Death by Activation the Sphingomyelin Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:73-77.

Ji L, Zhang G, Hirabayashi Y. (1995). Tumor Necrosis Factor alpha Increases Tyrosine Phosphorylation of a 23 kDa Nuclear Protein in U-937 Cells through Ceramide Signaling Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 489-96.

Ji L, Zhang G, Hirabayashi Y. (1995). Inhibition of Tumor Necrosis Factor alpha and Ceramide- Induced Internucleosomal DNA Fragmentation by Herbimycin A in U937 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 640-7.

Ji L, Zhang G, Uematsu S, Akahori Y, Hirabayashi Y (1995). Induction of Apoptotic DNA Fragmentation and Cell Death by Natural Ceramide. *FEBS. Lett.* 358: 211-4.

Johnson T.C. (1994). Negative Regulators of Cell Proliferation. *Pharmac Ther.* 62:247-265. Laugen P. Copyright 1994. Elsevier Science Ltd. Britain.

Kanety H, Hemi R, Papa MZ, Karasik A. (1996). Sphingomyelinase and Ceramide Suppress Insulin Receptor Substrate-1. *J. Biol.Chem.* 271: 9895-7

Karasavvas N, Erukulla RK, Bittman R, Lockshin R, Zakeri Z. (1996). Stereospecific Induction of Apoptosis in U-937 Cells by N-octanoyl-sphingosine Stereoisomers and N-octyl-sphingosine. The Ceramide Amide Group is Not Required for Apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 236: 729-37.

Karsan A, Yee E, Harlan JM. (1996). Endothelial Cell Death Induced by Tumor Necrosis Factor-alpha is Inhibited by the Bcl-2 Family Member, A1. *J. Biol. Chem.* 271: 27201-4.

Kim M, Linardic C.M, Obeid L.M. Hannun YA.(1991). Identification of Sphingomyelin Turnover as an Effector Mechanism for the Action of Tumor Necrosis Factor and  $\gamma$ -Interferon. *J. Biol. Chem.* 266:484-498.

Kolesnick R.N, Hemer LR. (1990). Characterization of a Ceramide Kinase Activity from Human Leukemia (HL-60) cells. *J. Biol. Chem.* 265:18803-18808.

Kuang W, Silber E, Eppenberg V. Quantification of Cells Cultured on 96-well Plates. *Anal. Biochem.* 186: 16-19.

Kolesnick R.N, Krönke M. (1998). Regulation of Ceramide Production and Apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 643-665.

Krebs H.B. 1992. Nuevos Métodos en el Tratamiento del CaCu; Memorias. Universidad George Washington. Washington D.C., U.S.A. 158-165.

Lazcano PE, Rojas MR, López AM, López CL, Hernández AM. (1993). Instituto Nacional de Salud Pública de México. 35: 65-73.

Lee JY, Hannun YA, Obeid LM. (1996). Ceramide Inactivates Cellular Protein Kinase C $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 271: 13169-74.

Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knoop JL, Seth A, Davis RJ. (1993). cPLA2 is Phosphorylated and Activated by MAP Kinase. *Cell.* 72: 269-278.

Latinis KM, Koretzky GA. (1996). Fas Ligation Induces Apoptosis and Jun-Kinase Activation Independently of CD45 and Lck in Human T Cells. *Blood.* 87:871-5.

Long SD, Pekala PH. (1996). Lipid Mediators of Insulin Resistance: Ceramide Signalling Down-Regulates GLUT4 gene Transcription in 3T3-L1 Adipocytes. *Biochem. J.* 319: 179-184.

Machleidt T, Wiegmann K, Henkel T, Sütze S, Bacuerle P, Krönke M. (1994). Sphingomyelinase Activates Proteolytic I- $\kappa$ B- $\alpha$  Degradation in a Cell Free System. *J. Biol. Chem.* 269: 13760.

MacManus JP, Rasquinha Y, Walker T, Chakrvarthy B. (1996). Apoptotic Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells have Regularly Spaced Single Strand DNA Breaks and Increased DNA-dependent Protein Kinase Activity. *Hum. Cell.* 9: 197-204.

Mansat V, Bettaieb A, Levade T, Laurent G, Jaffrezou JP. (1997). Serine Protease Inhibitors Block Neutral Sphingomyelinase Activation, Ceramide Generation and Apoptosis Triggered by Daunorubicin. *FASEB J.* 11: 695-702.

Mathias S, Younes A, Kan CC, Orlow I, Joseph C, Kolesnick RN. (1993). Activation of the Sphingomyelin Signaling Pathway in Intact EL4 Cells and in a Cell Free System by IL-1 beta. *Science.* 259: 519-522.

McConkey David J, Goodrich David, Bucana Cora, Klostergaard Jim. (1996). The Human Retinoblastoma Gene Product Suppresses Ceramide-Induced Apoptosis in Human Bladder Tumor Cells. *Oncogene.* 13: 1693-1700.

Mc Gahon AJ, Nishioka WK, Martin SJ, Mahboubi A, Cotter TG, Green DR. (1995). Regulation of the FAS Apoptotic Cell Death Pathway by Abl. *J. Biol. Chem.* 270: 22625-31.

Merril AH, Hannun YA, Bell RM. (1993). Introduction: Sphingolipids and their Metabolites in Cell Regulation. *Adv. Lip. Res.* 25:1-24.

Monroy GA. (1991). Citotoxicidad de Linfocitos de Sangre Periférica sobre Células provenientes de Tumores de Cáncer Cervico-Uterino en presencia de IL-2 recombinante Humana. Tesis de Maestría. México, D.F; ENEP Zaragoza; UNAM. 93pp.

Nakamura Y, Nakashima S, Ojio K, Banno Y, Miyata H, Nozawa Y. (1996). Ceramide Inhibits IgE-Mediated Activation of Phospholipase D, but not of Phospholipase C, in Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3). *J. Immunol.* 156: 256-62.

Nakabo Y, Pabst M J. (1997). C-2-Ceramide and C6-Ceramide Inhibited Priming for Enhanced Release of Superoxide in Monocytes, but had no Effect on the Killing of Leukaemic Cells by Monocytes. *Immunol.* 90: 477-82.

ESTA TESIS HA DEBE  
REGISTRADA EN LA BIBLIOTECA  
NACIONAL DE LA UNAM

Nemenoff RA, Winitz S, Qian NX, Van Putten V, Johnson GL, Heasley LE. (1993). Phosphorylation and Activation of a High Molecular Weight Form of Phospholipase A2 by p42 Microtubule-Associated Protein 2 Kinase and Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 268: 1960-1964.

Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. (1993). Programmed Cell Death Induced by Ceramide. *Science.* 259: 1769-71.

Ohmori M, Shirasawa S, Furuse M, Okumura K, Sa Sasaki T. (1997). Activated Ki-ras Enhances Sensivity of Ceramide-Induced Apoptosis Without c-Jun-NH2-terminal kinase/stress- activated Protein Kinase or Extracellular Signal Regulated Kinase Activation in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 57:4714-7.

Okasaki T; Bielawska A, Bell RM, Hannun, Y.A. (1990). Role of Ceramide as a Lipid Mediator of  $1\alpha, 25$  -Dihydroxyvitamin D3 induced HL-60 Differentiation. *J. Biol. Chem.* 265: 15823-15831.

Okasaki T, Bielawska A, Domae N, Bell R.M., Hannun Y.A. (1994). Characteristics and Partial Purification of a Novel Cytosolic, Magnesium-Independent, Neutral Sphingomyelinase Activated in the Early Signal Transduction of a  $1\alpha$  25 Dihydroxy-Vitamin D3- Induced HL-60 Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* 269: 4070-4077.

OMS. (Organización Mundial de la Salud).(1995). Programas Nacionales de lucha contra el cáncer. Directrices sobre política y gestión. OMS. Ginebra.

Olshefski R, Taylor B, Heitger A, Hasegawa A, Ladish S. (1996). Induction of Programmed Cell Death and Immunosuppression by Exogenous Sphingolipids are Separate Processes. *Eur. J. Biochem.* 241: 47-55.

Pardee, AB. (1989). G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. *Science.* 246: 603-608.

Poliak K. (1996). Negative Regulation of Cell Growth by TGF- $\beta$ . *Biochem. Biophys. Acta.* 1242: 185-199.

Pushkareva M.(1995). Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol Today,* 16: 294-297.

Pushkaeva M, Chao R, Bielawska A, Merrill AH Jr, Crane HM, Lagu B, Liotta D, Hannun YA. (1995). Stereoselectivity of Induction of the Restinoblastoma Gene Product (pRb) Dephosphorylation by D-erythro-sphingosine Supports a Role for pRb in Growth Suppression by Sphingosine. *Biochem.* 34: 1885-92.

Quillet MA, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G. (1997). Implication of Mitochondrial Hydrogen Peroxide Generation in Ceramide-Induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 (34): 21388-95.

Quintans J, Killus J, McShan CL, Gottschalk AR, Dawson G. (1994). Ceramide Mediates the Apoptotic Response of WEHI 231 Cells to Anti-immunoglobulin, Corticosteroids and Irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 710-4.

Radin NS. (1994). Rationales for Cancer Chemotherapy with PDMP, a Specific Inhibitor of Glucosylceramide Synthase. *Mol. Chem. Neuropathol.* 21: 111-27.

Ramírez Gaytán. (1991-1992). *Boletín de Información Estadística de México*. No. 11. Sistema Nacional de Salud.

Reyes JG, Robayna IG, Delgado PS, Gonzalez IH, Aguilar JQ, Rosas FE, Fanjul LF, Galarreta CMR. (1996). c-Jun is a Downstream Target for Ceramide-Activated Protein Phosphatase in A431 Cells. *J. Biol. Chem.* 271: 21375-80.

Riboni L, Prinneti A, Bassi R, Caminiti A, Tettamani G. (1995). A Mediator Role of Ceramide in the Regulation of Neuroblastoma Neuro2a Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* 270: 26868-75.

Rother J, Van Echten G, Shwarzamann G, Sandhoff K. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:14.

Ruiz O. E., González L. G, escudero P, Sebastián M.E. 1994. Cáncer cervicouterino Microinvasor. Diagnóstico y Tratamiento. *Ginecol. Obstet. Mex.* 62:237.

Satta VM, Burl S, Liu L, Damen J, Chahine H, Krystal G, Eaves A, Eaves C. (1998). BCR-ABL Accelerates C2-Ceramide-Induced Apoptosis. *Oncogene.* 16: 237-248.

Sawai H, Okasaki T, Yamamoto H, Okano H, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Kumam, Ishikura H, Umehara H. (1995). Requirement of AP-1 for Ceramide- Induced Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells. *J. Biol. Chem.* 270: 27326-31.

Shellhaas JL, Zuckerman SH. (1995). In Vitro Detection of Apoptotic Stimuli by Use of the HL-60 Myeloid Leukemic Cell Line. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2: 598-603.

Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Morigochi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E. (1997). TAK-1 Mediates the Ceramide Signaling to Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 8141-4.

Shütze S, Potthoff K, macleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Krönke M. (1992). TNF Activates NFkB by Bosphatidylcholine-Specific Phospholipase C-Induced "Acidic" Sphingomyelin Breakdown. *Cell* 71: 765-776.



Sillence D J; Allan D. (1997). Evidence Against an Early Signalling Role for Ceramide in Fas-Mediated Apoptosis. *Biochem. J.* 324: 29-32.

Smyth MJ, Perry DK, Zhang J, Poirier GG, Alter N, Hannun YA, Obeid LM. (1996). p1CE: a Downstream Target for Ceramide-Induced Apoptosis and for the Inhibitory Action of Bcl-2. *Biochem. J.* 316 (Pt 1): 25-8.

Spence MW. (1993). Sphingomyelinases. *Adv. Lipid Res.* 26: 3-23.

Spiegel S, Olivera A, Carison RO. (1993). The Role of Sphingosine in Cell Growth and Transmembrane Signalling. *Adv. Lipid Res.* 25: 105-129.

Swenney EA, Sakakura C, Shirahama T, Masamune A, Ohta H, Hakomori S, Igarashi Y. (1996). Sphingosine and its Metylated Derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) Induce Apoptosis in a Variety of Human Cancer Cells. *Int. J. Cancer.* 66: 358-66.

Taga S, Carlier K, Mishal Z, Capoulade C, Manguency M, Lecluse Y, Coulaud D, Tetaud C, Pritchard LL, Tursz T, Wiels J. (1997). Intracellular Signaling Events in CD77- Mediated Apoptosis of Burkitt's Lymphoma Cells. *Blood.* 90: 2757-67.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV. (1993). A Novel Domain Within the p55 kd TNF Receptor Signals Cell Death. *Cell.* 74:845.

Tettamanti G, Prinetti A, Bassi R, Vianni P, Guiussani P, Riboni L. (1996). Sphingoid Bioregulators in the Differentiation of Cells of Neural Origin. *J. Lipid. Mediated. Cell. Signal.* 1-3: 263-75.

Van Veldhoven PP, Mannaerts GP. (1993). *Adv. Lip. Res.* 26:69.

Veldman RJ, Klappe K, Hoekstra D, Kok JW. (1998). Metabolism and Apoptotic Properties of Elevated Ceramide in HT29rev Cells. *Biochem. J.* 331: 563-569.

Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. (1996). Requirement for Ceramide-Initiated SAPK/JNK Signalling in Stress-Induced Apoptosis. *Nature.* 380: 75-9.

Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen N.I. (1985). A Detergent-Trypsin Method for the Preparation of Nuclei for Flow Cytometric DNA Analysis. *Cytom.* 6: 348-356.

Wakita H, Tokura Y, Yagi H, Nishimura K, Furukawa F, Takigawa M. (1994). Keratinocyte Differentiation is Induced by Cell Permeant Ceramides and its Proliferation is Promoted by Sphingosine. *Arch. Dermatol. Res.* 286: 350-4.

Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M. (1994). Functional Dichotomy of Neutral and Acidic Sphingomyelinases in Tumor Necrosis Factor Signaling. *Cell*. 78: 1005-15.

Wolff RA, Dobrowsky RT, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA. Role of Ceramide-Activated Protein Phosphatase in Ceramide-Mediated Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 269: 19605-9.

Wright SC, Zheng H, Zhong J. (1996). Tumor Cell Resistance to Apoptosis Due to a Defect in the Activation of Sphingomyelinase and the 24 KDa Apoptotic Protease. *FASEB. J.* 10: 325-32.

Wright S.C. (1992). *J. Cell. Biochem.* 48: 344.

Xu J, Yeh CH, Chen S, He L, Sensi ST, Canzoneiro LMT, Choi DW, HsuCY. (1998). Involvement of de Novo Ceramide Biosynthesis in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ /cycloheximide-Induced Cerebral Endothelial Cell Death. *J. Biol. Chem.* 273: 16521-16526.

Yang Z, Constanzo M, Golde D.W, kolesnick RN. (1993). Tumor Necrosis Factor Activation of the Sphingomyelin Pathway Signals Nuclear Factor Kappa B Translocation in Intact HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 20520-20523.

Yamada T, Okajima F, Ohwada S, Kondo Y. (1997). Growth Inhibition of Human Pancreatic Cancer Cells by Sphingosylphosphorylcholine and Influence of Culture Conditions. *Cell. Mol. Life. Sci.* 53: 435-41.

Yoshimura S, Sakai H, Ohguchi K, Nakashima S, Banno Y, Nishimura Y, Sakai N, Nosawa Y. (1997). Changes in the Activity and mRNA Levels of Phospholipase D During Ceramide- Induced Apoptosis in Rat C6 Glial Cells. *J.Neurochem.* 69: 713-20.

Younes A, Kahn DW, Besterman JM, Bittman R, Byun HS, Kolesnick RN. (1992). Ceramide is a Competitive Inhibitor of Diacylglycerol Kinase in Vitro and in an Intact Human Leukemia (HL-60) Cells. *J. Biol. Chem.* 267: 842-7.

Yusuf A, Hannun, Lina M Obeid. (1995). Ceramide: an Intracellular Signal for Apoptosis. *TIBS.* February; 73-78.

Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM, Hannun YA. (1996). Bcl-2 Interrupts the Ceramide-Mediated Pathway of Cell Death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5325-8.

## APÉNDICE 1

### Medio RPMI-1640.

El medio se utilizó para mantener en condiciones fisiológicas estables a las líneas celulares P388 y L929. El siguiente listado proporciona los componentes del medio.

Aminoácidos	mg/l
L-Arginina (libre de base)	200.00
L-Asparagina (Anhidra)	50.00
L-Aspártico	20.00
L-Cistina 2 HCl	65.20
L-Ácido Glutámico	20.00
L- Glutamina	300.00
Glicina	10.00
L-Histidina (libre de base)	15.00
L-Hidroxiprolina	20.00
L-Isoleucina	50.00
L-Leucina	50.00
L-Lisina Hcl	40.0
L-Metionina	15.00
L-Fenilalanina	15.00
L-Prolina	20.00
L-Serina	30.00
L-Treonina	20.00
L-Triptófano	05.00
L-Tirosina 2Na	28.83
L-Valina	20.00

<b>Vitaminas</b>	<b>mg/l</b>
Biotina	00.20
D-Pantotenato	00.25
Ácido Fólico	03.00
Cloruro de Colina	01.00
Mio-Inositol	35.00
Niacenamida	01.00
PABA	01.00
Piridoxina HCl	01.00
Riboflavina	00.20
Tiamina HCl	01.00
Vitamina B12	00.005

<b>Sales Inorgánicas</b>	<b>mg/l</b>
Nitrato de Calcio 4H <sub>2</sub> O	100.00
Cloruro de Potasio	400.00
Cloruro de Sodio	6000.00
Sulfato de Magnesio	48.84
Fosfato de Sodio dibásico (anhidro)	80.00

<b>Otros Compuestos</b>	<b>mg/l</b>
D-Glucosa	2000.00
Glutación reducido	01.00
Rojo Fenol, Na	05.00
HEPES	5958.00

Forma de prepararse : en 950 ml de agua pentadestilada se diluyen 10.39 g de RPMI -1640 (Sigma, USA), se adicionan 2.0 g de bicarbonato de sodio, además los antibióticos penicilina G100 u/ml y estreptomocina 100 µg/ml. Posteriormente se afora a un volumen de 1000 ml, agitándose hasta disolver sin sobre agitar. El medio se ajusta a un pH de 7.2 - 7.4, y se esterilizó con un filtro de membrana de 0.22 µm en presencia de CO<sub>2</sub>, finalmente el RPMI se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

## APÉNDICE 2

### Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS).

Esta solución se usó para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos de tiempo. La capacidad amortiguadora es proporcionadas por las sales de fosfatos. Los componentes químicos se diluyen en un volumen final de 1000 ml de agua pentadestilada.

Componentes	g
Cloruro de Magnesio	0.1
Cloruro de Calcio	0.1
Cloruro de Sodio	8.0
Cloruro de Potasio	0.2
Fosfato ácido de Sodio	2.16
Fosfato diácido de Potasio	0.2

En la mayoría de ocasiones se prescindió de calcio y magnesio, estas sales no son indispensables para la finalidad en este trabajo. Las restantes sales se diluyen en 800 ml de agua bidestilada por agitación. posteriormente se afora a un volumen final de 1000 ml y esta solución se ajusta a un pH de 7.2 - 7.4. la solución amortiguadora se esterilizó

utilizando filtros de membrana (Milipore, USA) con un poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , finalmente la solución se almacena a una temperatura de 4°C hasta el momento de uso.

### **APÉNDICE 3.**

#### **Verseno.**

Generalmente, esta solución se emplea para disolver la tripsina y poder desprender a las células adherentes. Sus componentes son los siguientes:

Tris base	3.04 g
Cloruro de sodio	8.00 g
Cloruro de potasio	0.40 g
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA)	0.40 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua destilada, el pH se ajusta a 7.7 con HCl y se afora a un litro. Esta solución se esteriliza por medio de autoclave.

### **APÉNDICE 4.**

#### **Preparación del colorante cristal violeta para medir proliferación.**

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6; la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 ml de ácido fórmico aforados a 500 ml con agua bidestilada. Una vez preparada la solución de cristal violeta es filtrada y posteriormenete usada. (Kuong et al,1989)

### **APÉNDICE 5**

#### **Tripsina al 0.05%**

La tripsina se utilizó para desprender a las células de los platos de cultivo y para las disgregaciones del tejido de cérvix. Esta se preparó disolviendo 0.025g de tripsina (Sigma, USA) en 500 ml de verseno, todo en condiciones de esterilidad

**Desactivación del Suero.**

Se tomo una botella de Suero Fetal de Bovino (Hyclone, USA) y se colocó en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se pasó a un baño maría a 57°C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 100 ml para su mejor uso.