



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“IMPORTANCIA DEL METABOLISMO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS COMO
POTENCIAL BLANCO FARMACOLÓGICO PARA LA INTERVENCIÓN
TERAPÉUTICA CONTRA EL CÁNCER “**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESINA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

JAVIER JIMÉNEZ GODÍNEZ

DIRECTOR DE TESINA: M. EN C. DAVID SEGURA COBOS

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA EDO. DE MÉXICO 2008



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacología de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud y Educación, FES Iztacala, UNAM, con la dirección del M. en C. David Segura Cobos, a quien agradezco su asesoría.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, que me ha permitido terminar una mas de mis metas a seguir, por darme la oportunidad de seguir adelante y levantarme por cada tropiezo que he tenido. Cuida a mi familia y ayúdame a ejercer dignamente mi profesión.

A la UNAM por hacerme sentir orgulloso de ser Universitario.

Agradezco a mi asesor David Segura Cobos por su tiempo y apoyo que me brindo durante el escrito y por tenerme mucha paciencia “GRACIAS”.

A la Dra. Beatriz Vázquez Cruz por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio y por su confianza brindada durante este tiempo.

A los revisores de esta tesina M. en C. Gloria Luz Paniagua, Carmen Álvarez Rodríguez, y Eric Monroy Pérez por sus comentarios y sugerencias.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesina a mis padres por darme la vida y estar siempre a mi lado, Por que siempre han luchado por hacer de mi un hombre de provecho, por darme la oportunidad de estudiar y aceptarme tal y como soy (tugo), gracias Mamá y Papá.

A mi querida esposa por brindarme su apoyo y su comprensión en la realización de este trabajo y por haberle dado vida a mi hija Vanessa Marian a quien deseo que descubra lo valioso que es el estudio.

A mis hermanos Isabel, Héctor, Adolfo, Santa, Amparo, Clara, Gilberto, y Teresa los cuales han compartido su vida conmigo, a ellos les agradezco las aportaciones realizadas, su paciencia que han tenido conmigo, por todos sus consejos y por la confianza que me han brindado, los quiero hermanos.

A mi Mamá Petra y a mi tío Rogelio por permitirme refugiarme en su hábitat y porque han sido parte de mi desempeño académico.

También quiero dedicarles este trabajo a las personas que hoy ya no están conmigo y sin embargo han dejado una profunda huella en mi vida. A ti en especial mi hermano Adolfo, quien me inspiro e impulso el inicio de mi carrera, porque contigo aprendí que la vida no es tan fácil como yo creía..... Pero aún así es demasiado hermosa como para no disfrutarla.

A todos mis amigos y compañeros de mi querida FES- Iztacala, de la carrera de biología en sus diferentes etapas y quienes convivieron conmigo: Sergio, Gabriel, Oscar, Andrés, Dolores, Nicté, Mayeli, Magdalena, Aníbal, Miriam, Alfredo, Alberto, Jaime, Gabriela, Ángeles, Guille, Agustín, Martín, Josué, Enrique, La china, Alejandra, El chavo guango, Víctor, Rubén y todos aquellos por los cuales les pido disculpas por no mencionarlos.

Como poder olvidar a todos los compañeros (as) de la Cruz Roja de Tlalnepantla y Hospital General de Atizapan de Zaragoza que de una u otra he compartido ideas y proyectos de investigación de laboratorio en el área laboral.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
I. CICLO CELULAR.....	1
Regulación Del Ciclo Celular.....	2
II. APOPTOSIS.....	3
Tipos De Muerte Celular.....	3
Fases De La Apoptosis.....	4
Diferentes Vías Que Activan La Apoptosis.....	5
III. EL CÁNCER.....	6
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	11
IV. LÍPIDOS.....	11
V. ESFINGOLÍPIDOS.....	12
Regulación Del Destino Celular Por Los Esfingolípidos.....	16
Señalización Celular Activada Por Ceramida.....	16
Señalización Activada Por Ceramida 1 Fosfato.....	18
Señalización Activada Por Esfingosina 1 Fosfato.....	19
Agrupación De Receptores En Membrana Rica En Ceramida.....	20
VI. ELIMINACIÓN DE TUMORES POR APOPTOSIS MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE CERAMIDA	
La Ceramida Exógena.....	21
La Ceramida En La Síntesis <i>Di Novo</i>	23
La Hidrólisis De Esfingomielina.....	25
La Hidrólisis De Esfingolípidos.....	27
Inhibición En La Síntesis De Glucocilceramida.....	29
Inhibición De La Hidrólisis De Ceramida Por N-Oleiletanolamina.....	31
Control De Ceramida En La Conversión De Esfingomielina.....	35
Elevación De Ceramida Por Tetradecanoilforbol Acetato (TPA) Y Radiación (XRT).....	41
CONCLUSIÓN.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45

ABREVIATURAS

Células cancerígenas de próstata (LNCaP)
Ceramida (Cer)
Ceramida cinasa (Cerk)
Ceramida-1-fosfato (C1P)
Coenzima (CoA)
Diacilglicerol (DAG)
Esfingomielina (SM)
Esfingomielinasa (SMS)
Esfingomielinasa ácida (A-SMS)
Esfingomielinasa neutra (N-SMS)
Esfingosina (S)
Esfingosina cinasa (SK)
Esfingosina-1-fosfato (S1P)
Especies de oxígeno reactivo (ROS)
Factor de necrosis tumoral (TNF)
Familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR)
Fosfatidilcolina (PC)
Fosfatidilserina (FS)
Fosforilación mediante proteínas (SR)
Glicoesfingolipido (GLS)
Glucosilceramida (GlcCer)
Glucosilceramida sintasa (GlcCers)
Hexadecilfosfolina (HePC)
Hexadecilfosfoserina (HePS)
La proteína cinasa C (PKC)
M (mitosis)
Multirresistencia a fármacos (MDR)
Oleoiletanolamina (OE)
Proteína cinasas dependientes de ciclinas (CDK)
Proteína inhibidora de caspasa 8 (FLICE)
Proteínas que inhiben la apoptosis (IAPs)
Proteína Fas (Fas)
Second mitochondrial activador of caspases (Scam)
Serina palmitoil-CoA transferasa (SPT)
Terapia de radiación (XRT)
Tetradecanoilforbol acetato (TPA)

ÍNDICE DE PIE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de la esfingomielina, esfingosina y ceramida. Pág. 13
- Figura 2.** Síntesis y degradación de esfingolípidos. Pág.15
- Figura 3.** El balance entre ceramida y sus metabolitos rigen el destino celular. Pág. 16
- Figura 4.** Principales proteínas activadas por ceramidas. Pág.17
- Figura 5.** Mecanismos de transducción activados por los receptores de S1P. Pág. 20
- Figura 6.** El efecto con tratamiento de gemcitabina en los niveles de ceramida y el empalme alternativo de Bcl-x y caspasa 9. Pág. 24
- Figura 7.** Los efectos de D609 en DNR y MTX activa la producción de ceramida y hidrólisis de SM. Pág. 25
- Figura 8.** El Efecto D609 en la producción de ceramida activada por dosis bajas de DNR y MXT. Pág. 26
- Figura 9.** Incremento del nivel de ceramida son 5 uM de S1P. Pág. 28
- Figura 10.** S1P, induce apoptosis en la sobre expresión de células m SPP-1. Pág. 29
- Figure 11.** Síntesis de ceramida desde esfingomielina. Pág. 31
- Figura 12.** El incremento de masa de ceramida en células WEHI-231 JM después de la exposición con OE. Pág. 33
- Figura 13.** Activación de N-SMS. Pág. 34
- Figura 14.** Conversión de Ceramida en esfingomielina. Pág. 35
- Figura 15.** Estructura química de HePC y HePS. Pág. 35
- Figura 16.** El efecto citotóxico e inducción de apoptosis por HePC. Pág. 37
- Figura 17.** La prueba de TUNEL en células HaCaT tratadas con HePC. A) etanol al 0.1 % B) 25 umol/l de MEPC. C) 0.1 % de sulfito de dimetil D) 25 umol/l de HePS. Pág. 38
- Figura 18.** La inhibición de proliferación celular y biosíntesis de fosfatidilcolina por HePC. Pág. 40
- Figura. 19.** Inhibición en formación de esfingomielina y los niveles elevados de ceramida por HePC. Pág. 40
- Figura 20.** TPA sensibiliza células LNCaP a los efectos de radiación *in Vitro* Pág. 42
- Figura 21.** El efecto de inhibición de ceramida sintetasa en la apoptosis de células LNCaP tratadas con TPA, XRT o la combinación de ambos. Pág. 49

RESUMEN

El cáncer se define como la proliferación desordenada de células que adquieren la capacidad de invadir a otros tejidos, de enviar células cancerosas a distancia (metástasis) y eventualmente de matar al huésped. El cáncer corresponde a un grupo de más de 200 enfermedades provocadas por la división celular no controlada. A partir de cambios en los genes de las células normales, la muerte regulada (apoptosis) no sucede. El estudio de esfingolípidos comprende un grupo de moléculas estructurales bioactivas, que en su metabolismo regulan y controlan para llevar a cabo su función. La estimulación ha aumentado varios mecanismos moleculares y bioquímicos que involucran respuestas biológicas en su medio, senescencia y apoptosis. La ceramida se forma mediante la síntesis *di novo* de esfingolípidos y por hidrólisis de esfingomielina (SM) convirtiendo la esfingosina (S), donde cada lípido bioactivo tiene respuestas o receptores específicos como pueden ser; Palmitol CoA, DHCer, SK, PC, SMS, DAG, GSL, etc. La acumulación de ceramida activa SMS, la biosíntesis *di novo* de esfingolípidos, inducción de citocinas, TNF, Fas, por respuestas de tensión. Por ejemplo temperatura, radiación, luz UV, hipoxia y fármacos anticancerígenos. El tratamiento de tumores con uno o más fármacos que elevan la ceramida puede ajustar y arreglar los procesos desenfrenados para mantener o agravar el crecimiento excesivo, la angiogénesis y características de la metástasis de tumores. Estos tratamientos podrían elevar la producción de los factores de crecimiento, receptores y otras sustancias que reducen la efectividad de la ceramida. Células de tumores que no se adaptan sufren apoptosis y dejan las células adaptadas libres para crecer y, finalmente, subyugar su organización.

I. EL CICLO CELULAR

Antes de iniciar a discutir el tema es conveniente comprender la importancia que tiene el ciclo celular y la apoptosis.

El ciclo celular está dividido en cuatro fases principales. La célula recién dividida por mitosis comienza el estadio denominado G_1 (G procedente del inglés *gap*, que significa "intervalo"), donde la célula crece y aumenta de tamaño. Las células contienen una cantidad diploide de cromosomas ($2n$), con una copia heredada de cada progenitor. Cuando la célula ha alcanzado cierto tamaño entra en la fase S (síntesis), que implica la duplicación del ADN formándose una copia de cada cromosoma. Después de atravesar la fase G_2 , donde la célula comprueba que se ha completado correctamente la replicación del ADN y se produce la síntesis de los componentes necesarios para la mitosis, se inicia la llamada fase M (mitosis) que concluye con el nacimiento de las dos células hijas. La fase M se divide en varias etapas: durante el periodo de profase, los cromosomas se condensan gracias a la mayor compactación del ADN. Durante la metafase las cromátidas hermanas producidas por la replicación del ADN en la fase "S" (Síntesis) se alinean en el centro de la célula permaneciendo adheridas a la altura del centrómero y de múltiples puntos a lo largo de toda su longitud. En la anafase, las cromátidas hermanas se separan y se desplazan hacia polos opuestos del huso mitótico, con lo que una de las dos cromátidas hermanas se distribuye a cada célula hija. Finalmente, en la telofase los cromosomas segregados se descondensan y se produce la división física del citoplasma en dos células hijas, proceso denominado citocinesis. Después de la división, las células regresan a la fase G_1 y el ciclo celular se completa (Curtis y Barnes, 2000).

Regulación Del Ciclo Celular

Para todos los organismos es esencial que las diferentes fases del ciclo celular estén correctamente coordinadas, es decir, las fases deben seguir un orden estricto y cada una de ellas debe completarse antes de que se inicie la siguiente. Los errores que surgen durante la coordinación del proceso pueden conducir a alteraciones cromosómicas importantes, como por ejemplo a la pérdida de cromosomas completos o parte de ellos, o a la distribución inadecuada del material genético en las dos células hijas. Por tanto, el control del ciclo celular eucariota es muy estricto y está regulado por proteínas denominadas proteínas cinasas, cuya función es la de activar determinadas proteínas por fosforilación. A su vez, las concentraciones de estas enzimas se encuentran reguladas por otras proteínas, llamadas ciclinas, que aumentan y disminuyen durante el ciclo celular. Por tanto, estos complejos proteicos se denominan proteína cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y sólo son activos si están constituidos por una subunidad ciclina y una subunidad catalítica de proteína cinasa, ya que las ciclinas son las enzimas que determinan qué proteínas serán fosforiladas por el complejo CDK-ciclina, y de esta manera regulan el avance de la célula a través del ciclo celular (Albert, 1996).

En organismos multicelulares el control preciso del ciclo celular, durante el desarrollo y el crecimiento, es decisivo para determinar el tamaño y la forma de cada tejido. La replicación celular se ve afectada por una serie de señales extracelulares, como por ejemplo el número y tipo de células adyacentes, y otras de carácter intracelular como el propio tamaño de la célula o el programa de desarrollo que deba completar. La mayor parte de las células se retira del ciclo en G_1 y entra en el estado G_0 para diferenciarse. Muchas de estas células diferenciadas nunca retornan al ciclo para replicarse de nuevo, conociéndose con el nombre de células post mitóticas. No obstante,

algunas de estas células diferenciadas (como fibroblastos y linfocitos) pueden volver al ciclo y replicarse, entrando directamente en la fase S (Tapia, 2003; Voet, 1996).

II. APOPTOSIS

La apoptosis es una forma de muerte celular, caracterizada por cambios morfológicos y bioquímicos, mantiene la homeostasis entre la proliferación y la muerte celular; la alteración en su regulación contribuye a la patogénesis de cáncer, infecciones, autoinmunidad y neurodegeneración (Sánchez-Torres, 2003).

La apoptosis es la muerte celular programada o suicidio celular. Cuando esto ocurre la célula se contrae y se desprende de sus vecinas, la cromatina se condensa formando una o varias manchas cerca de la membrana nuclear. Poco después se fragmenta en numerosos cuerpos apoptóticos que engloban fracciones de las células siendo finalmente fagocitados (Duke, 1996)

Tipos De Muerte Celular

Actualmente se conocen dos formas de muerte celular en los organismos: necrosis y apoptosis. La necrosis descrita por Virchow (1858) se define como fenómeno degenerativo producido por daño repentino y severo. En la necrosis se observan numerosas células vecinas sometidas a este proceso, cubriendo una extensión variable con desintegración. La membrana celular permite el escape al exterior de elementos tóxicos que provocan un proceso inflamatorio que tendrá efecto nocivo en el organismo. El material cromático sufre una extensión irregular. Las causas son agentes tóxicos, traumáticos e hipóxicos; siempre patológicos.

La apoptosis es un proceso de ejecución codificado genéticamente, a diferencia de la necrosis afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio

extracelular de su contenido, resultando un proceso silencioso, sin inflamación. La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura en forma coordinada y caracterizada. La apoptosis se divide en tres fases (Hengartner, 2000).

Fases De Apoptosis

a) Fase de iniciación: Se desencadena por señales intra y extracelulares, las primeras por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca), la señal extracelular se desencadena de la célula blanco (vía extrínseca). La inducción puede ser fisiológica (hormonas y citocinas), biológicas (virus parásitos), química (fármacos) ó física (radiaciones) (Sánchez, 2003).

b) Fase de ejecución: La célula que recibe la señal pierde contacto con las demás células; el citoplasma se contrae, disminuyendo en tamaño, en la mitocondria se desacopla el transporte de electrones de ATP, la cromatina se condensa y se fragmenta. Finalmente, genera vesículas apoptóticas que dirigen dicha señal, hacia la maquinaria enzimática denominadas "caspasas", que son un complejo de proteasas de cisteina y aspartato. Se han descrito 12 caspasas humanas que son sintetizadas por zimógenos, por lo que requieren de proceso proteolítico para volverse activas. Constan de tres dominios: N-Terminal, subunidad p20 y subunidad pequeña p10. Su función destaca en la inactivación de proteínas que normalmente protegen a la célula de la muerte apoptótica, reparación de DNA, organización del citoesqueleto y participan en la destrucción del DNA nuclear, en la activación de "CAD" (activación de la caspasa Dnasa) e induce la expresión de señales para fagocitar (Gómez, 2000). Un evento importante para evaluar la apoptosis es mediante la determinación de sus cambios morfológicos donde se puede identificar una célula

apoptótica por la presencia de la condensación de la cromatina nuclear y de cuerpos apoptóticos. Otro análisis más detallado está asociado a la fragmentación de la doble cadena nuclear de DNA en las regiones de unión de los nucleosomas. Los fragmentos oligonucleares son evaluados por electroforesis en gel de agarosa, que presenta un patrón característico en escalera. Por el contrario, la necrosis muestra un patrón de degradación del DNA al azar que se traduce en una mancha difusa en el gel. El descubrimiento de este patrón distintivo de fragmentación del ADN ha permitido reconocer este proceso bioquímicamente y ofreció un punto inicial para el estudio de los mecanismos responsables de la apoptosis (Gómez, 2000).

La vía extrínseca establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas, una familia de receptores se ha identificado como "Fas" que desencadena por unión a su ligando "FasL", provocando el reclutamiento del complejo "DISC" (complejo de señalización para inducir muerte celular) al dominio citoplasmático de "Fas". "DISC" se une con la pro-caspasa 8, autoactivándose de la familia "Bcl-2" (Nagata, 1999).

Diferentes Vías Que Activan La Apoptosis

La vía intrínseca se activa por estrés y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros proapoptóticos de "Bcl-2", como "Bax". Esto provoca la liberación de citocromo C al citosol, disminuye el potencial de membrana y desestabilización. En el citosol el citocromo C se une a "apaf-1" en presencia de ATP, formando un apoptosoma el cual recluta y activa caspasa 9 y ésta a su vez a 3,6, y 7. Éstas reparan DNA y se encuentran en el citoesqueleto de la membrana nuclear (Kroemer, 1998).

c) La fase de eliminación: es donde las células que están muriendo por apoptosis son removidas por células fagocíticas, donde participan fagocitos profesionales y no profesionales (Células dendríticas, epiteliales, fibroblastos). Existen varios mecanismos de reconocimiento que involucran varios receptores que funcionan en forma aislada, simultáneamente. Entre ellas pueden ser algunas lectinas, integrinas, receptores Scavenger, ABC, y receptores de complemento. Los linfocitos apoptóticos en la pérdida de asimetría de la membrana celular que están expuestas las moléculas de fosfatidilserina (FS), inducen la señal de fagocitar (Gregory, 2000).

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo. Existen mecanismos pro o anti apoptóticos regulados genéticamente, que actúan en forma activa (pues consumen energía) y equilibrada. Entre la familia que regula la apoptosis se encuentran las proteínas que inhiben la apoptosis (IAPs) miembro de la familia "Bcl-2" y las Proteínas inhibidoras de caspasa 8 (FLICE). Las primeras proteínas regulan la activación de las pro-caspasas y mientras que el segundo nivel involucra la inhibición directa de las caspasas activas. La "IAPs" están reguladas por la proteína "Scam" (segundo activador de caspasa mitochondrial) en humanos (Gozani, 2002).

La familia "Bcl-2" controla la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo C, mientras que la familia "FLUP", "v-FLIP2 y "c-FLIP" inhiben la apoptosis inducida por los receptores "Fas" y "TNFR1" entre otros. Éstas participan en el control de la muerte celular inducida por activación. Las alternativas de una misma vía de actuar en pro o en contra de la apoptosis se repiten en otros mecanismos (Thome, 2001). Otra vía importante es la ceramida que veremos más adelante.

III. EL CÁNCER

El cáncer es la segunda causa más común de muerte en México después de las enfermedades cardiovasculares. Afecta a individuos de todas las edades y a una extensa variedad de órganos (Becerril, 2004). El cáncer se define como un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos (Fodde, 2002). La célula cancerosa, en cierta forma escapa al control que normalmente regula el crecimiento celular, mostrando numerosos cambios metabólicos en las propiedades de la superficie celular (membrana). Las células normales tienden a establecer contactos celulares con las células vecinas, el movimiento de las prolongaciones celulares es más lento y se produce inhibición de la división celular. Por el contrario las células cancerosas no se adhieren, no hay inhibición de la mitosis ó división celular, existe mayor número de prolongaciones en su superficie celular, y los movimientos son más intensos (Voet, 1992).

El tejido canceroso establece competencia con los tejidos normales por los nutrientes; como las células cancerosas continúan proliferando indefinidamente, los tejidos normales sufren gradualmente muerte por falta de nutrientes (Fodde, 2002).

Dado que el cambio que convierte una célula somática en una célula cancerosa es genético, éstas transmiten sus características asóciales a su descendencia, de modo, que las células pueden diseminarse por la sangre o la linfa a sitios del cuerpo alejado del origen; en estos sitios las células establecen nuevos focos de crecimiento invasor y destructivo que se llama metástasis (Weidner, 1991).

Las células del cáncer se desarrollan a partir de células normales en un proceso complejo denominado transformación. El primer paso es la iniciación, en el cual un cambio en el material genético de la célula la prepara para transformarse en cancerosa. Dicho cambio es causado por un agente llamado carcinógeno que puede ser un producto químico, un virus, la radiactividad o la luz solar. Sin embargo, no todas las células son igualmente susceptibles a los agentes carcinógenos. Una alteración genética en la célula u otro agente, conocido como promotor, incluso una irritación física crónica, pueden aumentar la posibilidad de las células para convertirse en cancerosas (Tapia, 2003). El segundo paso es la promoción donde una célula que ha iniciado su cambio se transforma en cancerosa, donde el ADN sufre cambios que son a menudo difíciles de detectar. Algunas veces un cambio en el tamaño o forma de un cromosoma determinado indica cierto tipo de cáncer, y los cánceres se clasifican de acuerdo al tejido celular donde se originan, por ejemplo los provenientes de células epiteliales se denominan carcinomas, los de células musculares se denominan sarcomas. Entre los cánceres que no pertenecen a ninguna de las dos categorías se encuentran las diversas formas de leucemias y células del sistema nervioso. Los cánceres tienen subdivisiones de acuerdo con el tipo celular, la localización en el cuerpo y la estructura del tumor. En paralelo se relacionan los tumores maligno y benigno; por ejemplo el adenoma (tumor epitelial), siendo un tumor maligno corresponde a un adenocarcinoma; otro ejemplo un condroma y un condromasarcoma, siendo respectivamente, tumores de cartílago benigno y maligno. Cuando las células cancerosas permanecen agrupadas en una masa única se dice que es un tumor benigno, terminando la fase de promoción y la fase de progresión es cuando la célula experimenta una o más nuevas mutaciones, produciendo un tumor maligno, donde las células invaden tejidos circundantes (Morabia, 2004).

Los factores de riesgo para contraer cáncer, indican que es una enfermedad multifactorial donde la edad, el sexo, la raza y la herencia se conocen como factores genéticos determinantes de riesgo, (Hanahan 2000). La dieta, los hábitos tóxicos ó químicos como el tabaco, el estilo de vida, el medio en general e incluyendo la infección por microorganismos (bacterias, virus, parásitos, etc.), son factores que actúan sobre el genoma de la célula como indicadores y promotores tumorales en la transformación celular (Murgia y col., 2006).

El cáncer es tratado actualmente mediante la combinación de cirugía, radiación y quimioterapia. La cirugía o la radioterapia tratan el cáncer que se encuentra confinado localmente, mientras que la quimioterapia elimina las células cancerosas que se han escapado de esta región. Algunas veces la radiación o la quimioterapia se administran antes de la cirugía para disminuir el tamaño del tumor, o después de la misma para destruir cualquier célula cancerosa que haya quedado. La quimioterapia combinada con la cirugía aumenta el período de supervivencia para aquellos pacientes con cáncer de colon, de mama o de vejiga que se ha extendido hacia los ganglios linfáticos cercanos. La cirugía y la quimioterapia pueden, en algunas ocasiones, curar el cáncer de ovario avanzado (Dolmans, 2003).

Los fármacos antineoplásicos están agrupados en varias categorías: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides derivados de plantas, antibióticos antitumorales, enzimas, hormonas y modificadores de la respuesta biológica. A menudo, dos o más fármacos se utilizan en combinación (Danaei G, 2005). El motivo principal de la quimioterapia combinada es utilizar fármacos que actúen sobre diferentes partes del proceso metabólico de las células, incrementando así la probabilidad de que puedan morir muchas más células cancerosas. Además, los efectos secundarios tóxicos de la quimioterapia se pueden reducir cuando se combinan fármacos con

diferentes toxicidades, cada uno en una dosis más baja de la que se hubiera necesitado si se usara solo. Por último, algunas veces se combinan fármacos con propiedades muy diferentes. Por ejemplo, los fármacos que matan las células tumorales se pueden combinar con los que estimulan el sistema inmunológico (Page, 1998).

HIPÓTESIS

La acumulación de ceramida produce apoptosis o muerte celular programada, mediante el metabolismo de esfingolípidos, el cual puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades con cáncer.

OBJETIVO

Realizar una revisión bibliográfica sobre la investigación básica de las diferentes vías de acumulación de ceramida y sus análogos, así como la potencialidad de emplearse en la quimioterapia del cáncer.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se han escrito más de 1000 artículos de investigación sobre la muerte celular programada (apoptosis) por intervenciones que elevan la concentración de ceramida (Cer) en la célula. Algunos estudios han mostrado que también estimulando el retardo en la formación de esfingolípidos en la proliferación celular, en inducir apoptosis y viceversa. El equilibrio entre estos dos aspectos está entrañado en las células cancerosas. El tratamiento de tumores con fármacos que eleven la ceramida puede ajustar o arreglar los procesos desenfrenados para mantener o agravar el excesivo crecimiento, la angiogénesis y características de la metástasis. Para ayudar a este acercamiento, esta revisión cataloga muchos de los fármacos que actúan en los aspectos diferentes del metabolismo de la ceramida (Radin, 2003).

IV. LOS LÍPIDOS

Son sustancias de origen biológico solubles en disolventes orgánicos y casi insoluble en agua. Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas de gran importancia, ya que: constituyen las principales reservas energéticas de los seres vivos, forman parte de las membranas celulares, y regulan la actividad de las células y los tejidos. Así las grasas, aceites, ciertas vitaminas, hormonas y la mayor parte de los componentes no proteicos de las membranas son lípidos (Lehninger, 1995).

Una de las funciones más interesantes de los lípidos en el contexto de la biología celular es su capacidad de regular numerosos procesos cruciales para la vida de las células, en particular los esfingolípidos (Vázquez, 2003).

V. LOS ESFINGOLÍPIDOS

Son lípidos complejos cuyo esqueleto está constituido por una base de cadena larga denominada esfingosina, en lugar de glicerol. Son componentes importantes de las membranas celulares, debido a su naturaleza anfipática. Bajo el punto de vista estructural, todos los esfingolípidos contienen tres componentes básicos, un grupo acilo (procedente de un ácido graso), una molécula de esfingosina (o su derivado hidrogenado) y una cabeza polar. La zona apolar puede estar formada de un ácido graso de longitud variable unido al carbono-2 de la cadena base y diversas cabezas polares unidas al carbono-1. En el caso de la esfingomielina el grupo hidrofílico es la fosforilcolina (Figura 1), mientras que en el caso de los glicoesfingolípidos es un azúcar. El ácido graso de longitud variable (2-28 carbonos) unido a la esfingosina o cadena similar forma la familia de ceramida, una molécula hidrofóbica cuya producción es incrementada bajo estímulos de estrés. (Futerman y Hannun, 2004).

Los esfingolípidos se han revelado recientemente como elementos clave en las cascadas de transducción de señales que regulan procesos importantes de la fisiología celular tales como crecimiento, diferenciación y muerte celular. Consecuentemente, la biología de los esfingolípidos se ha convertido en una diana importante para la investigación en la señalización celular. Los esfingolípidos tienen doble papel como moléculas bioactivas: por un lado, actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares, pero además, regulan la dinámica de las membranas biológicas formando parte de los microdominios de las membranas llamados balsas lípidicas (Brown, 2000).

Los principales esfingolípidos bioactivos incluyen, ceramida (Cer), esfingosina (S), ceramida-1-fosfato (C1P) y esfingosina-1-fosfato (S1P) y median respuestas celulares como proliferación, diferenciación y muerte celular. Entre todos ellos destaca la ceramida, que es el centro de la ruta de síntesis y degradación de esfingolípidos y se podría considerar como regulador del destino celular (apoptosis) (Devlin, 2004).

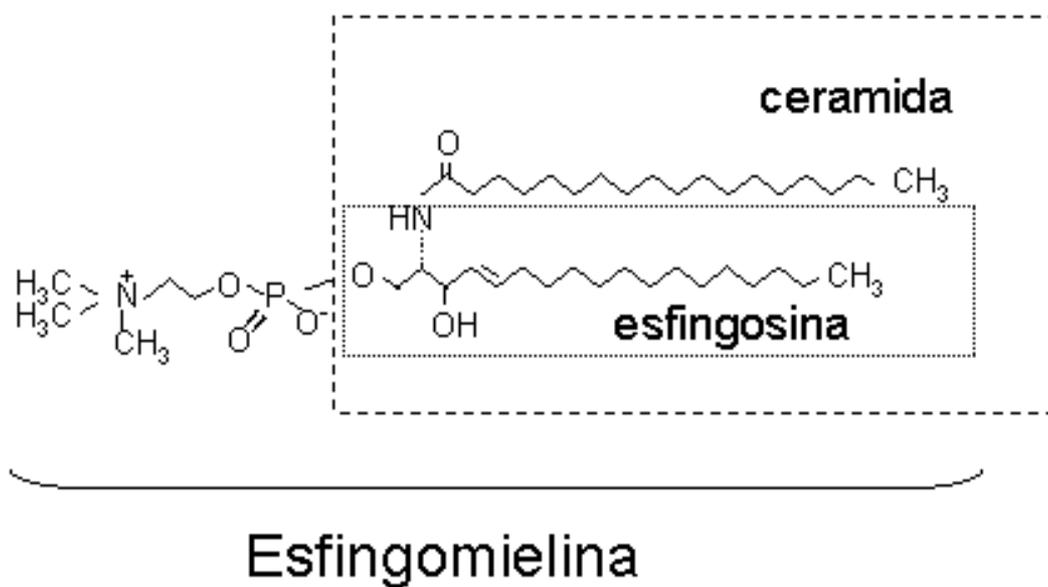


Figura 1. Estructura química de la esfingomielina, esfingosina y ceramida.

Hay dos vías principales por las que se puede generar ceramida: la síntesis *di novo* y mediante la degradación de la esfingomielina (SM) de la membrana por las esfingomielinasas (SMS).

La biosíntesis *di novo* de los esfingolípidos (Figura 2), se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi y empieza con la

condensación de la serina y normalmente el palmitoil CoA, llevada a cabo por la enzima serina palmitoil-CoA transferasa (SPT) para dar 3-cetoesfinganina, la cual es posteriormente reducida a esfinganina y convertida a dihidroceramida (DHCer) por la enzima dihidroceramida sintasa, también llamada ceramida sintasa. El siguiente paso es la desaturación de la dihidroceramida para generar ceramida, la cual sirve como precursor para esfingomielina y otros esfingolípidos complejos como cerebrósidos y gangliósidos, que se forman por la adición de sustituyentes específicos en la posición C1. La síntesis de esfingomielina está catalizada por la esfingomielina sintasa que transfiere fosforilcolina a la ceramida, generando SM y DAG. La ceramida también puede ser formada directamente de la esfingosina por la acción de la ceramida sintasa (García, 2003)

La degradación de ceramida incluye una desacilación llevada a cabo por las ceramidasa, que rinde un ácido graso y esfingosina. Esta reacción regula los niveles relativos de ceramida y esfingosina y es crucial para regular el destino celular. La esfingosina es rápidamente convertida por la enzima esfingosina cinasa a esfingosina-1-fosfato, que es uno de los esfingolípidos bioactivos más importantes. Por otro lado, la ceramida también puede ser fosforilada por la enzima ceramida cinasa para dar ceramida-1-fosfato.

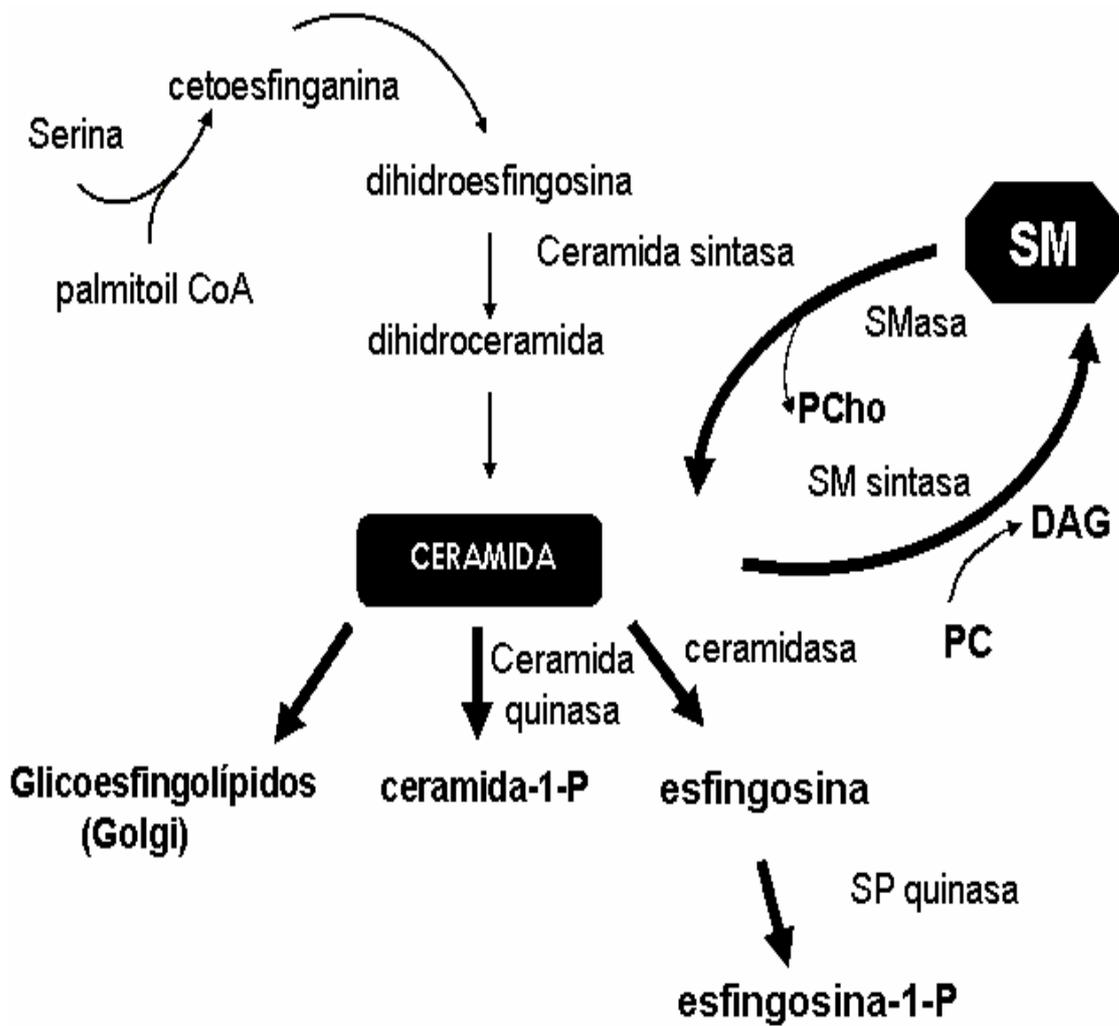


Figura 2. Síntesis y degradación de esfingolípidos.

La segunda vía para la generación de la ceramida incluye la degradación de la esfingomielina catalizada por la esfingomielinasa la cual rompe la esfingomielina para dar ceramida y fosforilcolina. La hidrólisis de la esfingomielina está considerada como la principal vía para la producción de ceramida como transductor de señales que regulan la muerte celular (apoptosis) (Andrieu-Abadie y Levade, 2002).

Regulación Del Destino Celular Por Los Esfingolípidos

Uno de los aspectos más interesantes de la función biológica de los esfingolípidos es su papel en la decisión del destino celular. Mientras que la ceramida activa señales de muerte, la ceramida 1-fosfato y la esfingosina 1-fosfato activan señales de supervivencia celular (Figura 3). Por lo tanto, los niveles relativos de estos metabolitos son los que determinarán si la célula entra en apoptosis o si prolifera. Es por ello que las reacciones catalizadas por la ceramida cinasa y por la esfingosina cinasa son fundamentales para determinar las funciones vitales de la célula. Ambas reacciones son altamente reguladas (Subbaiah, 2006).

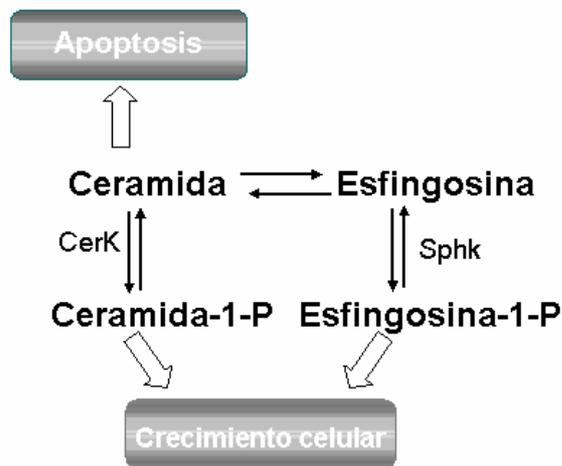


Figura 3. El balance entre ceramida y sus metabolitos rigen el destino celular.

Señalización Celular Activada Por Ceramida

La ceramida actúa como segundo mensajero activando numerosas vías de transducción de señales. La ceramida se genera bien por hidrólisis de la esfingomielina o bien mediante síntesis *di novo*, como consecuencia de numerosos estímulos tanto apoptóticos como de estrés, incluyendo ligandos de receptores de muerte, drogas quimioterapéuticas, radiación gamma o UV, choque térmico, privación de factores de crecimiento, hipoxia o exposición a cannabinoides (Carracedo *et al.*, 2006).

Entre las proteínas que interaccionan con la ceramida se incluyen: proteína cinasa activada por ceramida (CAPK), proteína cinasa supresora de "Ras" (KSR), las fosfatasa "PP2A" y "PP1B", "PKCζ", catepsina "D", "cPLA2" y "PKCζ" (Figura 4) (Heinrich et al, 2000; Ruvolo, 2003; Huwiler et al., 2004).

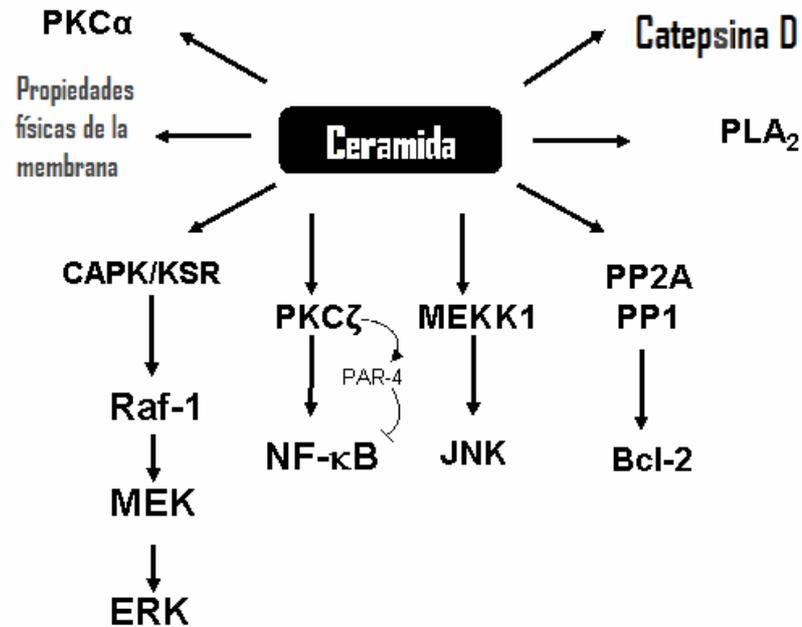


Figura 4. Principales proteínas activadas por ceramidas.

Otro mecanismo por el cual la ceramida puede inducir apoptosis es la regulación del potencial "redox". Se ha demostrado que tanto la ceramida como sus derivados glicosilados pueden inducir estrés oxidativo celular a través de disfunción mitocondrial, sobrerregulación de la NO sintasa, activación de la NADPH oxidasa y desregulación de enzimas antioxidantes. Datos recientes indican que la ceramida puede inducir apoptosis, al menos en parte, a través de un efecto directo en la mitocondria que induce la salida de proteínas desde el espacio intermembranal de la mitocondria al citoplasma. A concentraciones fisiológicas, la ceramida puede formar auténticos poros de membrana permeables a proteínas que han sido visualizados mediante microscopía electrónica (Siskind et al., 2006).

Señalización Activada Por Ceramida -1-Fosfato

La "C1P" puede ser producida por una "Cerk" dependiente de ATP, que fue clonada por Sugiura y representa una nueva clase de cinasas (Sugiura *et al.*, 2002). Esta cinasa es altamente específica para la ceramida y su actividad es dependiente de iones Mg^{2+} (Wijesinghe *et al.*, 2005) y de iones Ca^{2+} a través de su unión a calmodulina.

La C1P generada por "Cerk", ha sido implicada en diferentes procesos celulares como la respuesta inflamatoria, fagocitosis, inhibición de apoptosis, mitogénesis (Gómez-Muñoz, 2004) y mecanismos de patogenia inducidos por agentes infecciosos

Otras acciones biológicas de C1P incluyen la inhibición de la apoptosis y la inducción de la supervivencia celular. El mecanismo por el cual C1P ejerce este efecto probablemente sea la inhibición directa de la esfingomielinasa ácida (A-SMS) ya que se ha demostrado que la ceramida puede inhibir *in vitro* a esta enzima (Gómez-Muñoz *et al.*, 2004). La disminución de los niveles de ceramida llevaría a promover la activación de otras señales celulares inductoras de la supervivencia celular. En este sentido, se ha demostrado que la C1P induce activación de la vía PI3K/PKB, la cual es el principal mecanismo por el que promueven supervivencia celular los factores de crecimiento (Gómez-Muñoz *et al.*, 2005). El mismo grupo ha mostrado que la C1P estimula la síntesis de ADN y la división celular en fibroblastos (Gómez-Muñoz *et al.*, 1997).

Señalización Activada Por Esfingosina-1-Fosfato

La esfingosina-1-fosfato (S1P) se genera a partir de la esfingosina por la acción de las esfingosina cinasas (SK1) y (SK2). La "SK1" es una enzima de supervivencia cuya expresión está aumentada en muchas células malignas. La inhibición de la actividad de estas enzimas con lleva un bloqueo de la proliferación e inducción de la apoptosis en células cancerígenas, por lo que los inhibidores de SK1 podrían tener un importante potencial terapéutico (French *et al.*, 2006). Sin embargo, SK2 parece tener un papel opuesto, ya que su sobreexpresión inhibe el crecimiento celular (Maceyka *et al.*, 2005).

Una vez generada, la "S1P" puede actuar tanto intracelularmente como segundo mensajero, como extracelularmente, uniéndose a receptores de membrana de los que es un ligando específico. Se han descubierto transportadores específicos que podrían exportar la "S1P" desde el interior celular al medio extracelular. Se han caracterizado 5 subtipos de receptores de "S1P" que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y que se han denominado: esfingosina-1-fosfato a esfingosina 5 fosfato (S1P a S5P). Las vías de señalización intracelular activadas por estos receptores son diversas ya que están acoplados a diferentes subtipos de proteínas G (Figura 5) (Sánchez y Hla, 2004).

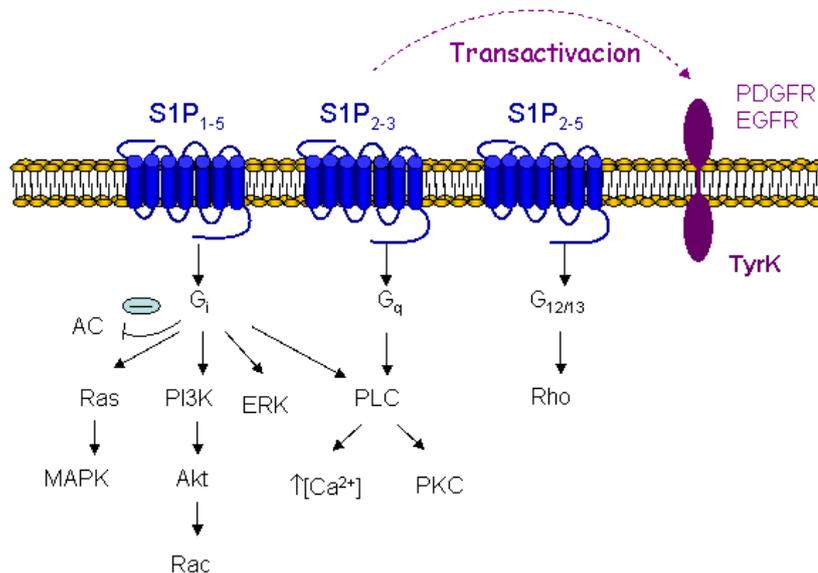


Figura 5. Mecanismos de transducción activados por los receptores de S1P.

Agrupación De Receptores En Dominios De Membrana Ricos En Ceramida

La ceramida ejerce también un papel biológico modificando las propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas. La esfingomielina está principalmente localizada en la cara externa de la membrana plasmática y forma parte de los microdominios de membrana denominados balsas lípidicas. La SMS secretada actúa sobre la esfingomielina de membrana generando ceramida. La formación de ceramida por la activación de SMS ha sido recientemente relacionada con la activación de señales de muerte, ya que puede inducir la agrupación de numerosos receptores de membrana (Bollinger *et al.*, 2005). Muchos receptores activan la liberación de ceramida que transforma pequeñas balsas de membrana, en grandes plataformas que median la agrupación de receptores los cuales se activan y transmiten señales al interior celular (Bollinger *et al.*, 2005).

Recientes estudios indican que la activación y consiguiente translocación a la membrana de la SMS es lo que produce generación de ceramidas en la cara externa de la membrana celular. La generación de ceramidas dentro de las balsas altera las propiedades biofísicas de esos microdominios de membrana y promueve su agregación en dominios mayores que son críticos para la oligomerización de receptores y el ensamblaje de estructuras más complejas (Bollinger *et al.*, 2005).

VI. ELIMINACIÓN DE TUMORES POR APOPTOSIS MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE CERAMIDA

La Ceramida Exógena

Los esfingolípidos constituyen el 0.1 – 0.2 % de la dieta en EE.UU. (Ensminger, 1994). Su cuantificación se ha realizado por cromatografía de gases en muchos alimentos que se consumen en la dieta diaria, los de mayor contenido en esfingolípidos son en primera estancia los productos lácteos seguidos por la carne, los peces, los huevos, las sojas y las verduras (Whitaker, 1996; Jensen, 1995).

La cadena del esfingolípido y los ácidos grasos varían con el tipo de alimento, así como su variabilidad estructural, al igual que la forma de hidrolizarse y de ser absorbidos (Vieu, 2002). La esfingosina se eleva rápidamente en las células intestinales y su degradación junto con los ácidos grasos, permitiendo así su reincorporación en el intestino, donde una pequeña cantidad de la base del esfingoide se encuentra en la linfa, sangre e hígado (Schmelz *et al.*, 1996). La esfingosina y su metabolismo hacia ceramida controlan y regulan diferentes funciones en las células intestinales (Nyberg, 1997).

Estudios experimentales en animales han mostrado que los esfingolípidos en los alimentos inhiben la carcinogénesis del colon. La ingestión de esfingolípidos en la dieta diaria puede reducir el riesgo de cáncer de colon, ya que el metabolismo *di novo* de esfingolípidos induce arresto del crecimiento, proliferación, diferenciación celular de células neoplásicas, provocando apoptosis (Merrill, 1995).

Para comprobar estos estudios se ha purificado la esfingomielina, alimentando a ratones con una dieta de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) para inducir tumores de colon, comparando con ratones con dieta normal baja en esfingolípidos, mientras que el grupo experimental se suplementó su dieta con esfingolípidos del 0.1 %. Los resultados muestran

que el grupo con suplemento de esfingolípidos redujo el número de criptas colónicas aberrantes como un marcador de carcinógenos del colon (Dillehay *et al.*, 1994).

Otras investigaciones han mostrando una reducción de adenocarcinomas malignos. Mientras que los aumentos modestos en el consumo de esfingolípidos como parte de comidas, podrían reducir el riesgo de cáncer de colon en humanos (Vesper, 1999). Aunque no existen estudios relevantes en humanos, que muestren como influyen los esfingolípidos para reducir el riesgo de cáncer de colon. No obstante, se sabe que la esfingosina y la ceramida pueden inducir apoptosis en células cultivadas "HT29" de adenocarcinoma humano (Schmelz *et al.*, 1998), ya que se ha encontrado que reduce el número de células neoplásicas. Como ya se ha mencionado anteriormente los esfingolípidos inhiben el crecimiento y algunos efectos citotóxicos de numerosas células transformadas en medios de cultivo, inhiben carcinógenos químicos inducidos (ésteres de forbol), que son promotores cancerígenos en muchas células. Mientras que la base del esfingoide y sus análogos inhiben el crecimiento y la proliferación cancerígena, evitando metástasis en células humanas. Por consiguiente, los esfingolípidos dietéticos pueden afectar células cancerígenas de colon (Vesper, 1999).

La Ceramida En La Síntesis *di novo*

La ceramida endógena estimula, a través del empalme alternativo los niveles de los factores proapoptóticos caspasa 9 y Bcl-x. El tratamiento de células A549 del adenocarcinoma pulmonar con el agente quimioterapéutico gemcitabina 1 μ M, que interviene en la síntesis *di novo* de esfingolípidos, triplicó los niveles de ceramida (Fig. 6). El pretratamiento con miriocina, un inhibidor específico de serina

palmitoiltransferasa (la primera enzima en la biosíntesis del esfingolípido), bloqueó el aumento en [3H]-ceramida en 24 h de exposición con la gemcitabina. Además, antes del tratamiento las células A549 con miriocina, redujeron los niveles basales de ceramida por 62%. Así el aumento en el nivel de ceramida en respuesta a la gemcitabina ocurrió en base a la vía de esfingolípidos para producir apoptosis. La regulación del proceso alternativo de pre-mRNA de caspasa 9 y Bcl-x, se examinó en respuesta a la ceramida (Chalfant *et al.*, 2002).

Los mecanismos que regulan la expresión del gen de caspasa 9, "Bcl-x" inducen apoptosis, mediante sus antagonistas "Bcl-x ligando" y caspasa "9b" que inhiben apoptosis, por respuesta a "FAS", "FNT", "Bax" y radiación UV. "Bcl-x" en el empalme alternativo es sensible a la quimioterapia, induciendo apoptosis. Estos estudios se mencionan en células A549, donde este mecanismo promueve la regulación de apoptosis por ceramida (Blázquez y col., 2002).

La ceramida induce apoptosis, regulando la fosforilación mediante proteínas (SR), esto indica que varias proteínas regulan la apoptosis por variantes que ocurren en el empalme, es decir "Bcl-x", caspasa 9 y "Bax", son afectadas por la ceramida, inducida por la vía del empalme alternativo. Los mecanismos de inducción de ceramida en el empalme definen un nuevo mecanismo del gen regulador en la apoptosis y los factores de respuesta extracelular (Vescovo y col., 2002). Un segundo mecanismo específico mediado por una fosfatasa de proteínas activada por ceramida y ceramida endógena generada por vía *di novo* de esfingolípidos. Un tercer mecanismo es la fase de inicio de apoptosis y sensibilización de células en la quimioterapia (Chalfant y col., 2002).

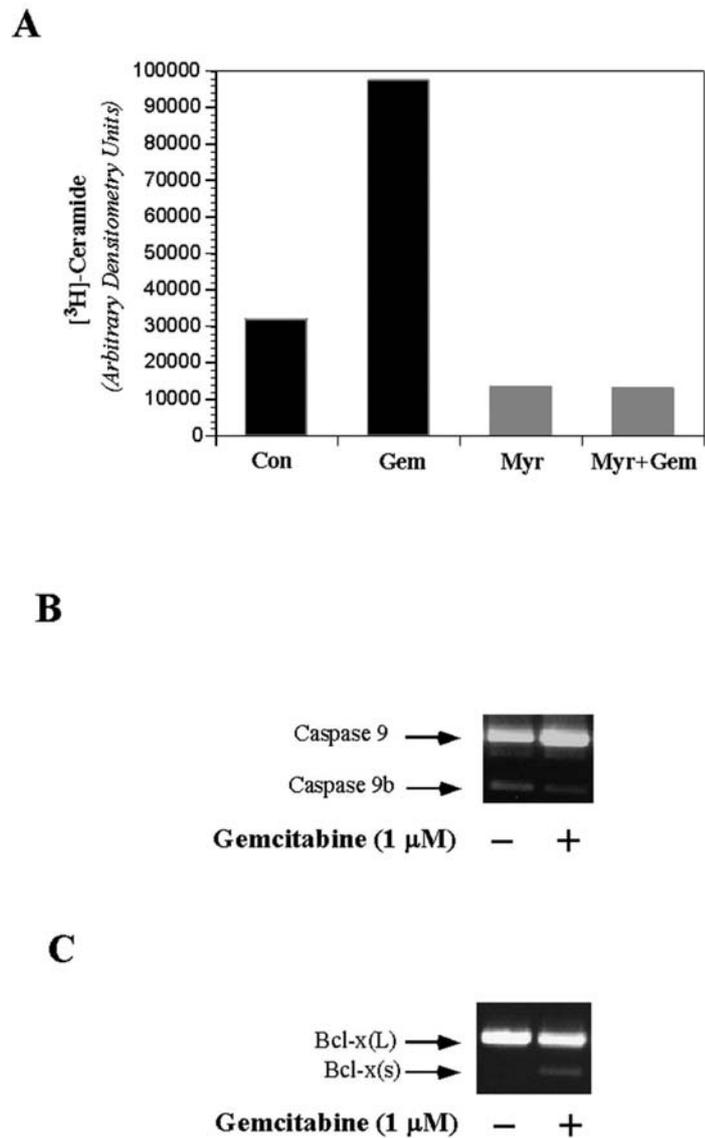


Figura 6. El efecto con tratamiento de gemcitabina en los niveles de ceramida y el empalme alternativo de Bcl-x y caspasa 9.

(Chalfant, 2002)

La Hidrólisis De Esfingomielina

Doxorubicina (DNR) y Mitoxantrona (MXT), están entre los compuestos antitumorales más usados en la oncología clínica, sobre todo en leucemias agudas (Fig. 7 y 8). DNR activa la degradación de esfingomielina en ceramida que lleva al ciclo de apoptosis. DNR y MXT

estimulan la esfingomielinasa neutra (N-SMS), con la subsecuente generación de ceramida, por la hidrólisis de SM, en células U937, D609 y HL-60 de leucemias humanas (Raggers y col., 1999). Adicionalmente, DNR y MXT estimulan la generación de diacilglicerol a partir de la hidrólisis de la fosfatidilcolina por la fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC).

El pretratamiento de células con el xantogenato D609, un inhibidor potente de PC-PLC, inhibe la formación del DAG permaneciendo el aumento de ceramida (Liu, 1998). Así las concentraciones pertinentes de 0.2 a 5 μM de DNR y MXT estimulan temporalmente la generación de ceramida derivada de SM, Lo cual inducirá la apoptosis (Lucci *et al.*, 1999).

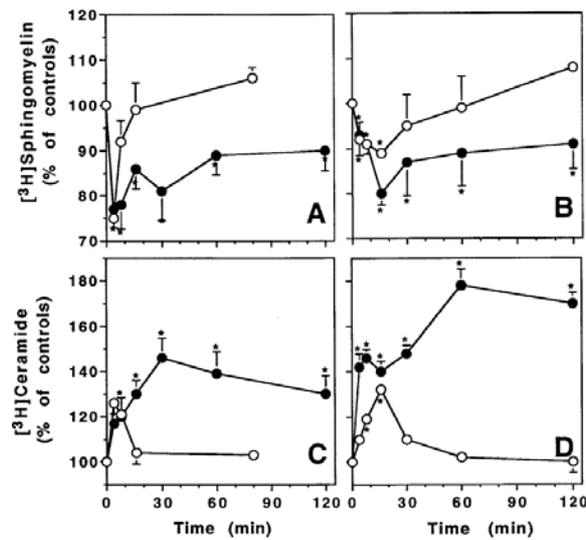


Figura 7. Los efectos de D609 en DNR y MXT activa la producción de ceramida y hidrólisis de SM. (Bettaieb, 1999).

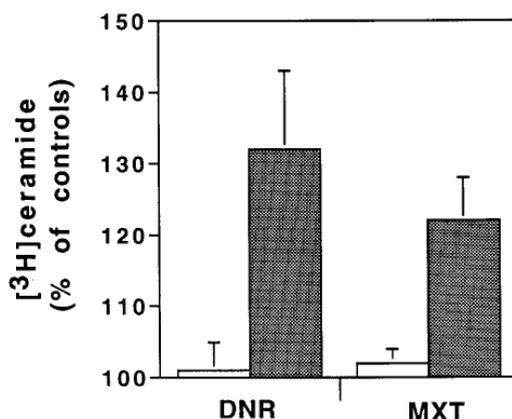


Figura 8. El Efecto D609 en la producción de ceramida activada por dosis bajas de DNR y MXT. (Bettaieb, 1999).

El efecto de DNR y MXT inducen un aumento transitorio de producción de DAG (diacilglicerol). La molécula de DAG juega un papel central en la apoptosis. En células U937, DAG activa la proteína cinasa (PK). El efecto de D609 en la vía de SM-Ceramida activada por DNR y MXT, como DAG es un oponente para SM-Ceramida, Se evaluó que D609 activa la hidrólisis de SM y genera ceramida. En células U937 con D609, DNR y MXT indujeron un aumento similar en ceramida, pero también llevaron un aumento sostenido de ceramida. Los efectos de D609 en dosis bajas no producen apoptosis en células leucémicas, además de inhibir la hidrólisis de SM y la síntesis de ceramida. Los efectos de D609 en dosis bajas no producen apoptosis en células leucémicas. Las implicaciones biológicas en el aumento de ceramida para cuantificar la muerte celular programada se observó un aumento en citotoxicidad y fragmentación de ADN al igual que los resultados en la morfología de células apoptóticas donde no hubo efecto significativo. El daño se atribuye a menudo a un efecto genotóxico, que en muchos casos a daño celular y esto depende de la dosis y el tiempo (Bettaieb, 1999).

La Hidrólisis De Esfingolípidos

La estimulación de la hidrólisis es otro estimulador en la proliferación de la esfingosina 1 fosfato (S1P), también es útil, cuando la fosfolipasa que actúa en S1P rinde una esfingosina que es prontamente aislada para producir ceramida. Los autores muestran evidencia y apuntan a S1P como el encargado de dirigir los niveles de ceramida (Le Stunff *et al.*, 2002).

Estudios en células cancerosas se ha demostrado que la actividad de SPP-1 y las proteínas parecen ser principalmente enriquecidas en las membranas plasmáticas (Radin N, 2003). El tratamiento de SPP-1 transfectada con S1P aumenta el nivel de ceramida en la membrana intracelular, disminuyendo la supervivencia y estimulando la apoptosis. Sin embargo, un sustrato apto para SPP-1 *in situ*, la dihidro S1P, no causó acumulación de ceramida o indujo apoptosis. La acumulación de ceramida inducida por S1P puede ser bloqueada por fumonisina B1, un inhibidor de ceramida, siendo parcialmente reducido por miriocina, un inhibidor de palmitoiltransferasa de serina, siendo el primer paso comprometido en la síntesis *de novo* de ceramida. Además S1P en ausencia de dihidro S1P, estimula la incorporación de [3H]-palmitato un sustrato para ambas palmitoiltransferasa serina y ceramida sintetasa en C16-ceramida. Colectivamente las funciones de SPP-1 regulan la biosíntesis de esfingolípidos e influye en el destino celular (Datta, 1988).

La ceramida se ha implicado como componente crítico en la apoptosis, la elevación de S1P juega un papel importante como citoprotector, particularmente oponiéndose en la apoptosis mediada por ceramida. La acumulación de ceramida se correlaciona con la inducción de apoptosis similar a los resultados obtenidos con NIH 3T3 de fibroblastos temporalmente transfectados con mSPP-1 con 5 μ M de S1P producen la elevación de ceramida (Figura 9) induciendo apoptosis (Figura 10). Por el contrario, el tratamiento con dihidro S1P no aumentó el nivel de ceramida y ningún efecto apoptótico.

El S1P, pero no dihidro S1P, incrementó el nivel de ceramida en células de sobreexpresión de mSPP-1, en riñón de embrión humano (HEK) 293. La Figura 10 muestra células HEK 293 fueron transfectadas con el vector que expresan mSPP1 incubados en ausencia o presencia de 5 μ M de dihidro S1P o S1P por 48 h. B) Los niveles de ceramida son elevados predominantemente en la membrana interna. El lisado fue preparado desde células tratadas con S1P y los niveles de ceramida indicados en la fracción celular.

5

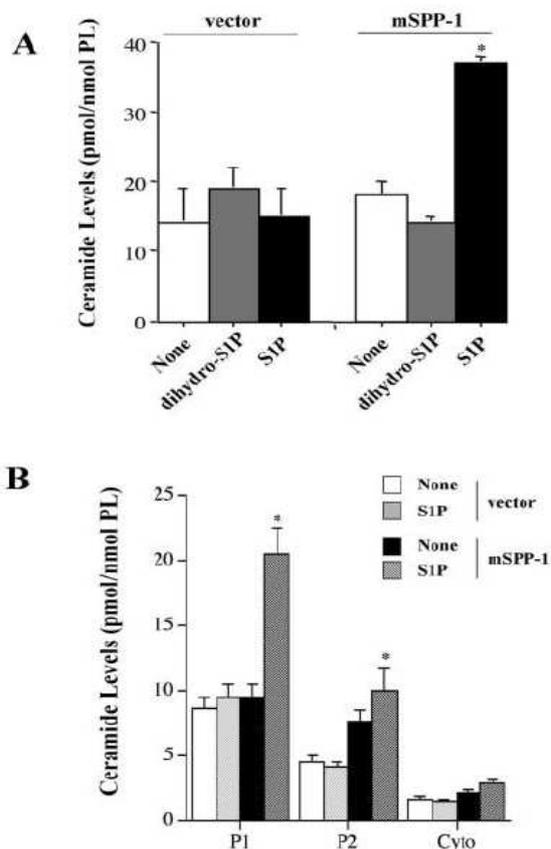


Figura 9. Incremento del nivel de ceramida son 5 μ M de S1P. (Le Stunff et al, 2002).

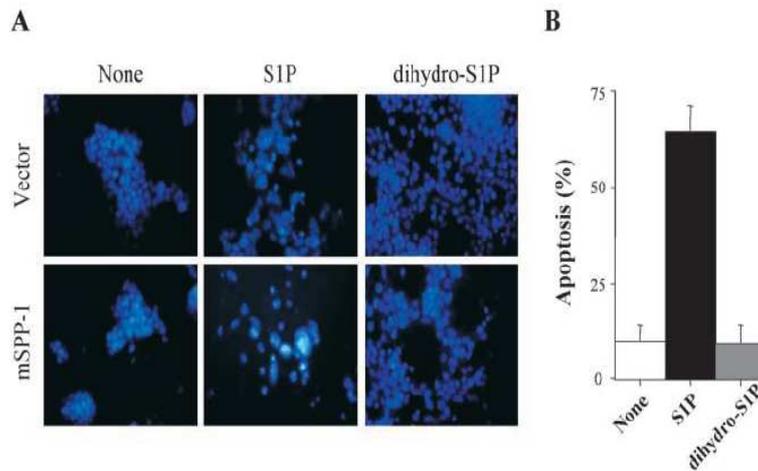


Figura 10. S1P, induce apoptosis por la sobre expresión de m SPP-1 en las células (Le Stunff et al, 2002).

Las células HEK 293 fueron tratadas por 3 días. En la Figura 10 se notan los núcleos fragmentados condensados, típicos de células apoptóticas transfectados con mSPP-1 tratados con S1P pero no con la dihidro-S1P. Los porcentajes de sobreexpresión de células apoptóticas de SPP-1 se determinó por microscopía de fluorescencia y se contaron por visualización de núcleos fragmentados indicando apoptosis en un mínimo de 500 células en cada campo.

Inhibición En La Síntesis De Glucosilceramida

Los glucoesfingolípidos (GLS), además de ser esenciales elementos estructurales de la membrana, participan en procesos como la proliferación y diferenciación celular (Watanabe y col. 1998). Observaciones recientes muestran que las células de cáncer presentan multiresistencia a muchos fármacos (MDR), característicamente muestran niveles elevados de un glucoesfingolípidido identificado como glucosilceramida (GlcCer); que puede estar asociado con la resistencia a la quimioterapia. Las células MDR se caracterizan por la alta resistencia a la toxicidad de los fármacos. Los quimiosensibilizadores son agentes que aumentan la sensibilidad de MDR a la influencia tóxica de fármacos previamente menos eficaces, que están ayudando a conocer el modo de acción de fármacos antineoplásicos (Lavie, 1996).

La Glucosilceramida es el precursor de los glucoesfingolípidos. Mientras que la ceramida es un segundo mensajero para la muerte celular programada, ambos regulan la proliferación y la apoptosis. La inhibición de la síntesis de GLS se relaciona con una serie de disfunciones celulares. Como la glucosilceramida sintasa y la esfingomielina sintasa se activan entre caspasas que son importantes transductores de señales fisiológicas y ejecutores de apoptosis inducidos por una variedad de estímulos exógenos, la inhibición de la enzima glucosiltransferasa hace que se acumule ceramida para estimular la apoptosis, cuando no se controla la síntesis de glucosil ceramida, esta es reducida o se anula.

Estudios sobre la inhibición de la glucosilceramida sintasa por PDMP (N-2-hidroxi-1-4 morfolinilmetil-2-fesnil de ceramida), un inhibidor sintético que actúa como análogo de ceramida, comparado con un homólogo en base a la cadena larga de PPMP y sus variantes estructurales (D-treo-1-fenil-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol (PPPP ó P4). Se han inspeccionado en aproximadamente 80 tipos de cánceres humanos, donde P4 es un inhibidor de crecimiento eficaz encima del rango similar de concentraciones que llevan a la acumulación de ceramida. Además, la expresión del sintetasa en macrófagos de adultos mayores, retarda la actividad de crecimiento en tumores malignos.

El fármaco tamoxifeno es un antineoplásico y narcótico que inhibe la sintetasa de GlcCer, actuando como anti estrogénico, bloqueando la glucosilación de ceramida siendo particularmente útil en células neoplásicas resistente a multifármacos (DRM), donde la ceramida exógena no produjo apoptosis, pero la combinación de Ceramida y Tamoxifeno lo hicieron. Este fármaco se usa comúnmente en quimioterapia para prevenir cáncer de seno y actúa bajando las concentraciones del glucoesfingolípidido, permitiendo actuar al sistema inmune para aliviar lesiones precancerosas (Lavie, 1997).

Inhibición De La Hidrólisis De Ceramida Por N-Oleiletanolamina

La generación de ceramida incluye la degradación de la esfingomielina catalizada por la esfingomielinasa (SMS) la cual rompe la esfingomielina para dar ceramida y fosforilcolina (Figura 11). La hidrólisis de la esfingomielina está considerada como la principal vía para la producción de ceramida como transductor de señales que regulan la muerte celular (Kolesnick, 1994).

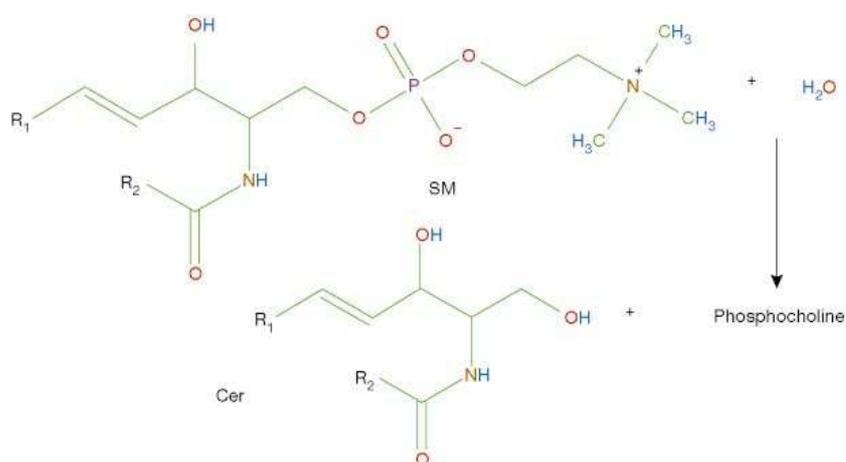


Figure 11. Síntesis de ceramida desde esfingomielina (Radin, 2003)

Al menos cinco subtipos diferentes de SMS han sido identificados basándose en su pH óptimo, localización subcelular y dependencia de cationes. (Marchesini y Hannun, 2004). Se han diferenciado en los efectos de esfingomielinasa ácida (A-SMS) y esfingomielinasa neutra (N-SMS), con respecto a la apoptosis (Liu, 1997). Ambas enzimas pueden ser activadas por el receptor de 55 kDa del factor de necrosis tumoral, TNF, así como por otros estímulos de estrés como la radiación (Andreu-Abadie y Levade, 2002).

La A-SMS se ha implicado en la apoptosis por inducción de radiación en ratones con linfoma donde se demostró la resistencia a la apoptosis en linfocitos. Otros estudios implican a N-SMS como mediador de apoptosis y que puede responder según la línea celular y la especificidad del tejido (Chmura, 1997b).

Trabajos previos han demostrado que la regulación baja en la producción de ceramida después de la selección de células con N-Oleoiletanolamina (OE) un inhibidor de ceramidasa, junto con la estimulación por radiación resultó en resistencia al daño del ADN induciendo apoptosis. Fueron expuestas células de WEHI 231 JM presentes en linfoma de célula B en murinos con OE donde activó N-SMS, induciendo la producción de ceramida y aumentaron en forma intracelular las especies reactivas de oxígeno (ROS). También induce permeabilidad mitocondrial, liberando citocromo C y apoptosis. Los resultados demuestran que la regulación baja en la actividad de N-SMS, se asocia con la apoptosis, con un daño mínimo inducido en el ADN. Además, los datos sugieren que agentes que modifican los blancos extracelulares responsables en la producción de ceramida seleccionan células resistentes para la radiación ionizante por apoptosis inducida a través de alteraciones en función mitocondrial (Chmura, 2000).

La selección de células WEHI-231 con OE aumenta la ceramida dependiendo de la dosis, la acumulación de ceramida con DAG cinasa ocurrió 12 h después de la exposición de células a las concentraciones de OE como se muestra en la figura 12

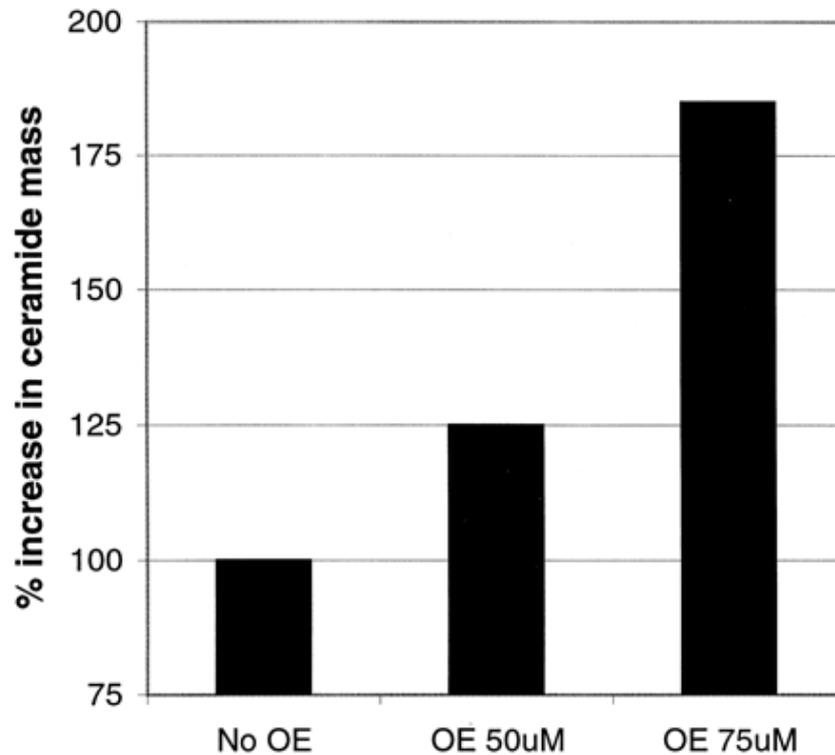


Figura 12. El incremento de masa de ceramida en células WEHI-231 JM después de la exposición con OE (Chmura, 2000).

Para determinar los mecanismos potenciales por la selección de células WEHI-231 de JM con OE producen un fenotipo resistente a la apoptosis, examinando si OE altera la actividad de SMS directamente. OE aumenta la actividad N-SMS en extractos celulares WEHI-231 JM con 75 μ M 394 % del control a 1 h. En contraste A-SMS se inhibió a 68%. Usando extractos celulares WEHI-231 en OE, el tratamiento activó la N-SMS a un máximo de 191% del control y A-SMS se inhibió a un 86 % en 1 h. Estos resultados demostraron que OE aumenta la actividad de N-SMS en WEHI-231 JM y se abroga con los extractos de WEHI-231 en células OE (figura 13).

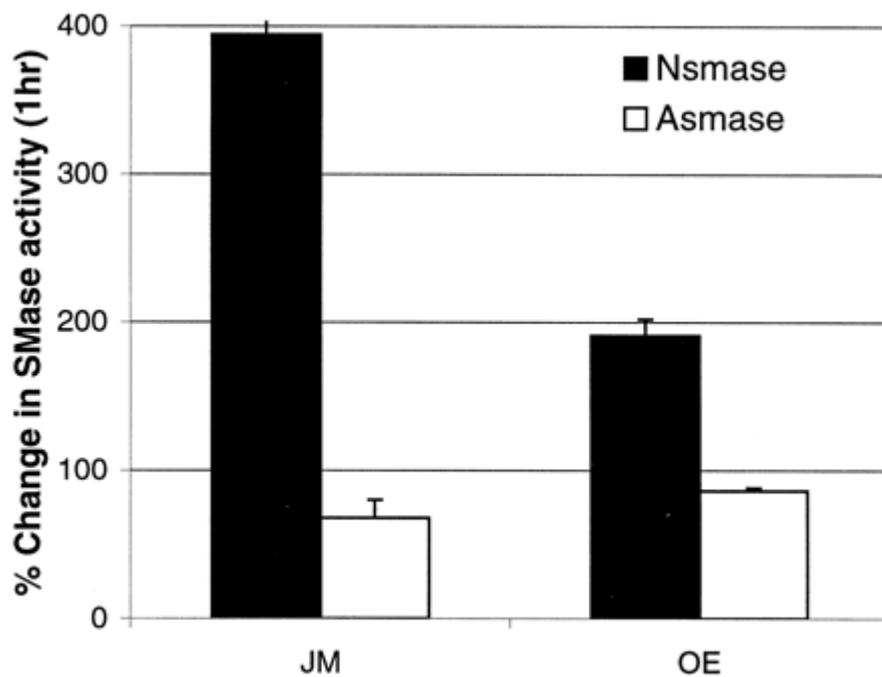


Figura 13. Activación de N-SMS (Chmura, 2000).

Los recientes estudios han demostrado que la transición de la permeabilidad mitocondrial (m) es un evento importante en la apoptosis, induciendo la producción de ceramida y aumento en forma intracelular de las especies reactivas oxígeno (ROS), esto ocurre por la liberación de citocromo C en el citoplasma y por la activación de la maquinaria apoptótica. Los estímulos para inducir apoptosis, como dosis tóxicas de ceramida exógena, inducen en (m) un bloqueo por la sobreexpresión de miembros de la familia de Bcl-2, Bcl-x.

MMP es una ceramida exógena y la producción de ROS en células WEHI-231 JM y EO, los datos representan una reducción en la permeabilidad mitocondrial, induciendo apoptosis.

Control De Ceramida En La Conversión De Esfingomieline

La ceramida normalmente se convierte en SM por transferencia de fosfocolina de PtdCho, dejando DAG (Figura 14).

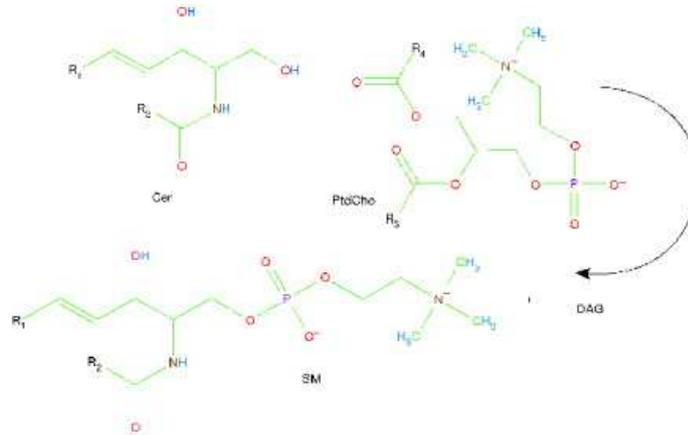


Figura 14. Conversión de Ceramida en esfingomieline (Radin, 2003)

Una nueva clase de análogos de fosfolípido antiproliferativo denominado, hexadecilfosfolina (HePC) (Figura 15). Un análogo de PtdCho que sirve como fármaco antineoplásico, puede retardar la síntesis de SM a partir de Cer (Radin, 2003).

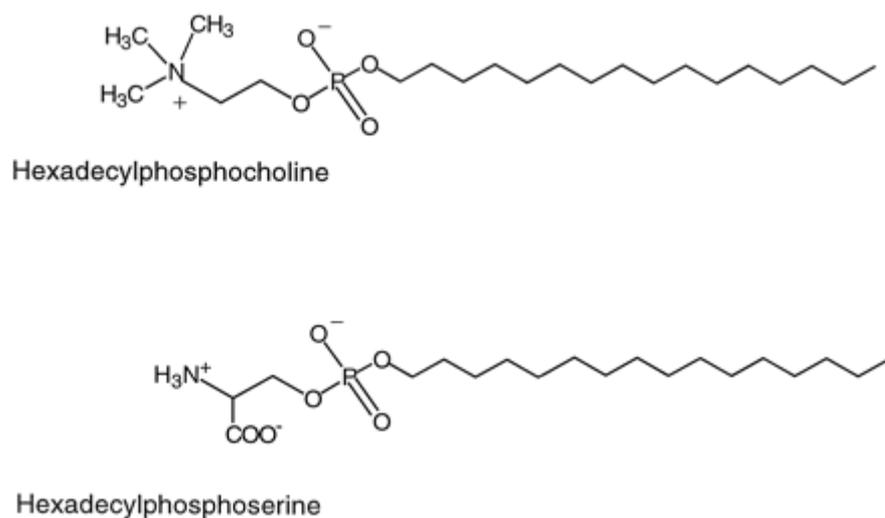


Figura 15. Estructura química de HePC y HePS (Wieder, 1998)

En busca de blancos celulares de HePC, Hexadecilfosfoserina (HePS), que inhiben la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC) en las líneas celulares y se diferencia de otros análogos de fosfolípidos como son: Alquifosfocolina, 1-O octadecil-2-O-metilglicero-3-fosfolina, y otros más en que no inhiben la proliferación celular. Sin embargo, HePC produce arresto celular, mediante una vía metabólica que se acopla a la biosíntesis de PC, donde HePC inhibió la incorporación de [3H] colina y [3H] serina de SM, aumentando la ceramida celular (figura 16).

El fármaco antineoplásico HePC, inhibe el crecimiento de tumores y se ha usado actualmente para el tratamiento de metástasis cutáneas de carcinomas mamarios. Muchas investigaciones mostraron que con 25 $\mu\text{mol/l}$ de HePC indujo apoptosis. Mencionado el metabolismo en la columna del lípido que usa serina fue mostrando que HePC disminuyó la incorporación de serina en la SM por 35% y simultáneamente aumentó la incorporación serina en la ceramida por 70%. La ceramida aumentó 53% en células tratadas con HePC comparadas con los controles (figura 16). La apoptosis inducida se bloqueó con fumonisina B1, (inhibidor de síntesis de ceramida) (Wieder, 1998).

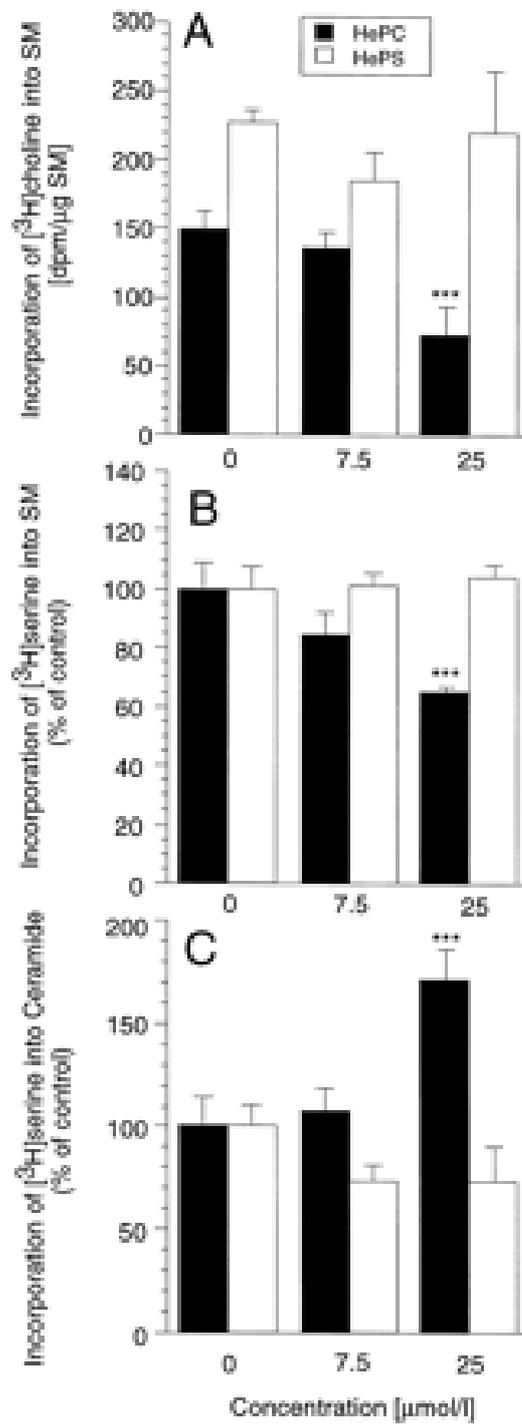


Figura 16. El efecto citotóxico e inducción de apoptosis por HePC (Wieder, 1998).

La habilidad de HePC de inducir apoptosis por la determinación de nucleosomas del citosol como resultado apoptótico del daño del ADN, se trataron células HaCaT con concentraciones no líticas de 7.5 y 25 $\mu\text{mol/l}$ de HePC, aumentando los nucleosomas del citosol aproximadamente en 240 y 450 % del control, respectivamente, considerando que el HePS no indujo daño de ADN. La apoptosis en la prueba de ELISA depende de la función de la membrana plasmática intacta de las células, el aumento de nucleosomas del citosol claramente se distingue de la apoptosis efectuada en HePC mostrando un solo nivel de la célula marcada en la prueba de TUNEL (ver Fig. 17), el control y el tratamiento de células HePS mostraron solo un marcado débil y difuso con 1-2 % de la población celular que es fluorescente (apoptosis), considerando que el tratamiento de HaCaT con HePC 25 $\mu\text{mol/l}$ aumentó el número significativo de fluorescencia (apoptosis) las células a aproximadamente 26% de la población celular (Wieder, 1998).

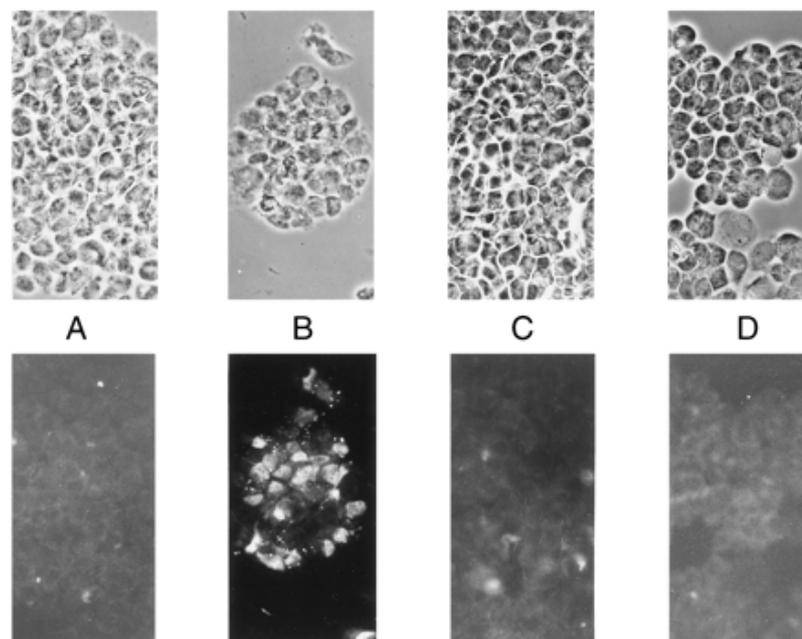


Figura 17. La prueba de TUNEL en células HaCaT tratadas con HePC.
A) etanol al 0.1 % B) 25 $\mu\text{mol/l}$ de HePC
C) 0.1 % de sulfito de dimetil D) 25 $\mu\text{mol/l}$ de HePS (Wieder, 1998).

Los efectos antiproliferativos efectuados por HePC se ha documentado en diferentes tumores y en diferentes líneas celulares, incluyendo en keratocitos humanos. Sin embargo, ningún dato estaba registrado en keratocitos humanos inmortalizados de la línea celular HaCaT. HePC inhibe la proliferación de células HaCaT con una concentración inhibitoria de aproximadamente 3 $\mu\text{mol/l}$, considerando que HePS no tenía este efecto y con una concentración de 25 $\mu\text{mol/l}$ de HePC la proliferación celular casi fue bloqueada completamente con respecto al control (Wieder, 1998).

Los efectos antiproliferativos de HePC eran por su habilidad de inhibir la incorporación de [metil-3] colina en PC, disminuyendo serina, este efecto eleva ceramida y a su vez inhibió la SM en presencia de 7.5 y 25 $\mu\text{mol/l}$ de HePC para después inducir apoptosis. HePS produce un efecto contrario a la apoptosis que es el de proliferación celular el cual fue tomado como control comparativo (ver Fig. 19) (Wieder, 1998).

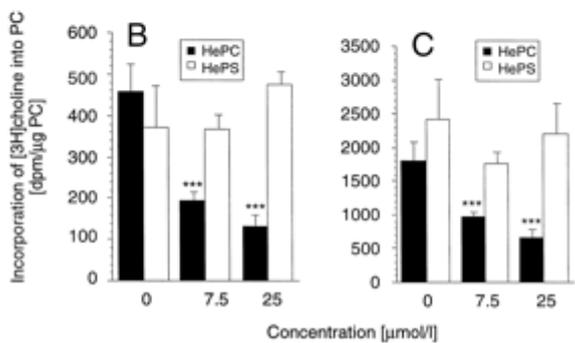
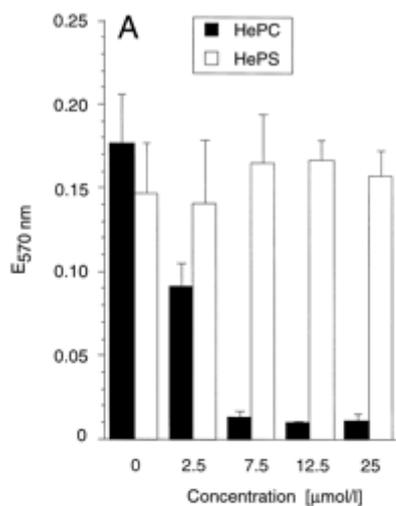


Figura 18. La inhibición de proliferación celular y biosíntesis de fosfatidilcolina por HePC (Wieder, 1998).

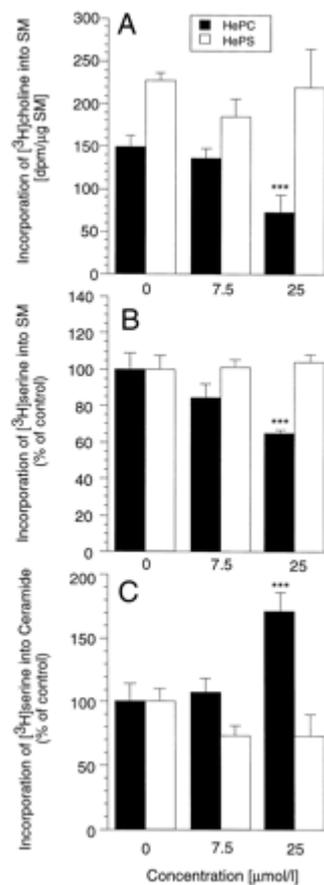


Figura 19. Inhibición en formación de esfingomielina y los niveles elevados de ceramida por HePC. (Wieder, 1998).

Elevación De Ceramida Por Tetradecanoilforbol Acetato (TPA) Y Radiación (XRT)

Líneas celulares derivadas del cáncer de próstata humana se consideran relativamente resistentes a la muerte cronológica inducida por radiación y apoptosis. En muchos estudios se investiga modular la respuesta de células LNCaP (células cancerígenas de próstata), a la terapia de radiación (XRT) por pretratamiento con 12-O-tetradecanoilforbolacetato (TPA), conocido como agente apoptogénico en células LNCaP (Garzotto, 1999).

El mecanismo predominante por el cual la radiación mata células, es que existe daño al ADN por efecto a la radiación induciendo inestabilidad genética, mutaciones y aberraciones cromosómicas (Ward, 1994). Un mecanismo alternativo es la generación de ceramida mediada por SMS en la respuesta para enfatizar una vía que involucra la síntesis *di novo* de ceramida. Estos estudios demostraron en diferentes células que la radiación puede activar ambos mecanismos para generar ceramida en un solo tipo celular. La apoptosis inducida sugiere que la resistencia de la radiación probablemente es regulada por una variedad de mecanismos cada uno de los cuales están asociados con una vía de muerte específica (Royai, 1996).

La PKC, activada por TPA induce actividad de ceramida sintetasa en células LNCaP. La generación de ceramida es rápida, perceptible por 1 h. y progresiva para 12 h. Esto se siguió por un formulario tardado de apoptosis que alcanzó los niveles máximos a 48 h. Las investigaciones en el mecanismo de generación de ceramida inducida por TPA en forma ácida o neutra no reforzaron las actividades de SMS. En contraste TPA indujo un aumento en la actividad de ceramida sintetasa que persistió por lo menos 16 h. El tratamiento con Fumonicina B1, inhibidor competitivo natural de ceramida sintetasa aparece ser requerida para la apoptosis de inducción por TPA en

células LNCaP. También se demostró que la activación de ceramida sintetasa requiere inducir radiación en células LNCaP (Garzotto, 1998).

La radiación en dosis de 10-20 Gy no indujo generación de ceramida ó apoptosis en células LNCaP debido a una falta de contestación apoptótica, pero se mostró que junto con TPA modula las respuestas de células LNCaP, produciendo ceramida y apoptosis. La figura 20 muestra la evidencia inicial de elevación de ceramida. Las células se trataron con 10 ng/ml de TPA llevando a la generación de ceramida por 3 h y apoptosis por 12 h. Existiendo una relación de dosis-respuesta para TPA sensibilizando las células a la apoptosis después de la irradiación. Los datos indicaron que TPA modula la resistencia de células LNCaP a la irradiación y a los efectos sinérgicos con la combinación (Kyprianou, 1997).

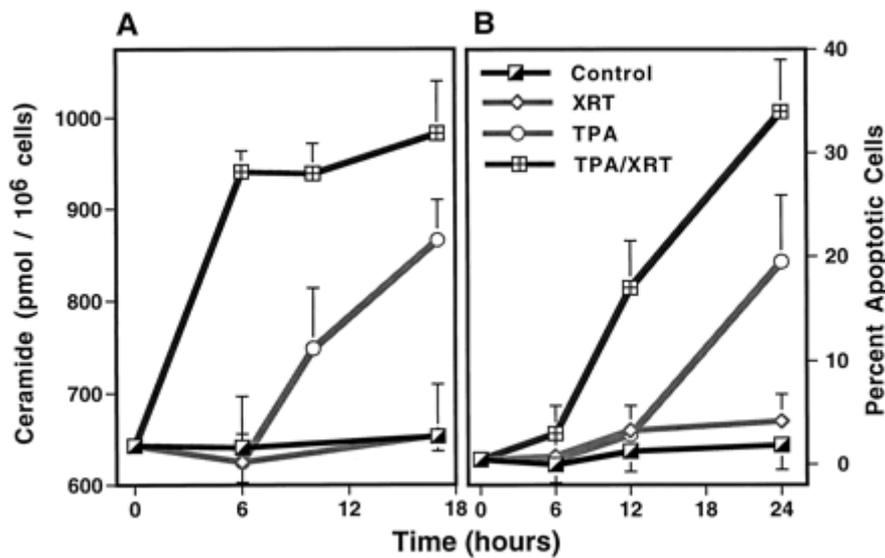


Figura 20. TPA sensibiliza células LNCaP a los efectos de radiación *in vitro*. A y B (Garzotto, 1998).

LA XRT REFUERZA LA CERAMIDA SINTETASA POR ACTIVACIÓN DE TPA

Estudios previos demostraron que la inducción de generación de ceramida por TPA se midió por la vía de activación de la enzima ceramida sintetasa (Haimovitz F, 1996).

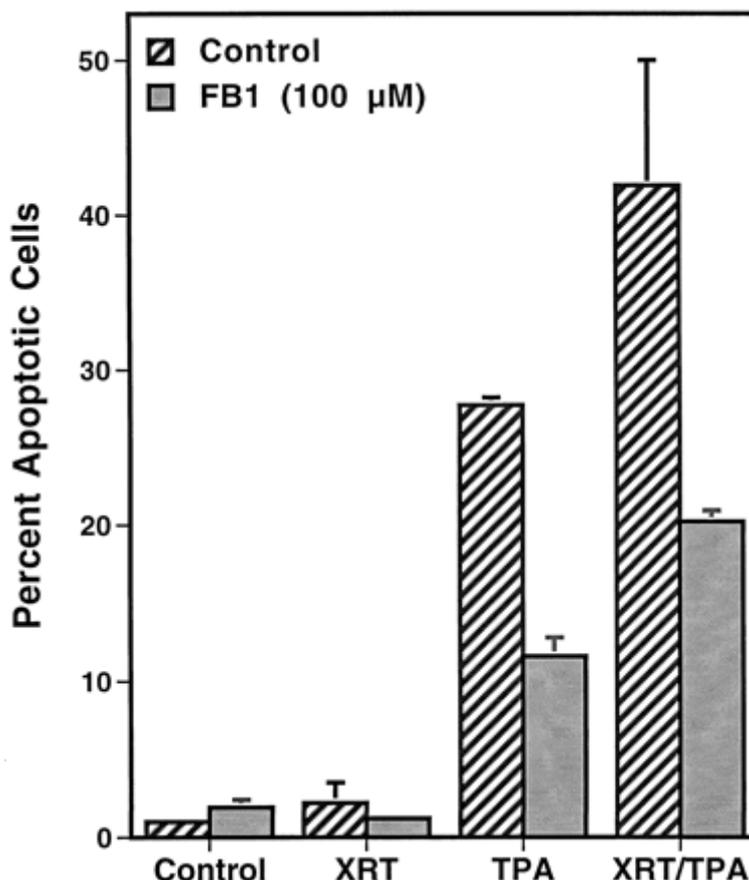


Figura 21. El efecto de inhibición de ceramida sintetasa en la apoptosis de células LNCaP tratadas con TPA, XRT o la combinación de ambos (Garzotto M, 1998).

En base a la generación proapoptótica de ceramida en la respuesta de TPA y XRT se usó fumonisina B1 como inhibidor competitivo específico de ceramida sintetasa. La Fig. 21 muestra que redujo la inducción de apoptosis en la respuesta a TPA a 24 h de 28 a 11% y la respuesta de TPA/XRT de 42 a 20 %. Estos datos apoyan el efecto sinérgico de TPA y XRT en la generación de ceramida y apoptosis en base a la regulación de activación de ceramida sintetasa en células LNCaP (Garzotto, 1998).

CONCLUSIÓN

El incremento de los niveles de la ceramida se asocia con la inducción del arresto del crecimiento celular y la apoptosis. Estos aumentos en ceramida se ven en respuesta a una variedad de estímulos (TNF- α , Interleucina-1, interferón gama, Vitamina D3, etc.) y en varias diferentes líneas celulares. La apoptosis puede ser inducida por citosina, radiación ionizante y por fármacos derivados de esfingolípidos. Existen muchos agentes extracelulares que promueven la producción de ceramida por hidrólisis de esfingomielina. La ceramida potencialmente actúa como un lípido fijador y puede estar implicado como mediador importante para regular el ciclo celular y la apoptosis que, dependiendo del contexto celular puede ser directo o indirecto para controlar el cáncer.

8. BIBLIOGRAFIA

Albert Lehninger, L (1995) **“bioquímica”**. Ed. Omega S.A. decimotercera ed. Barcelona, España. Pág. 860.

Albert, B. (1996). **“Biología Molecular de la Célula”**. Edit. Ediciones Omega, S.S Primera edición. Barcelona, España. 776-951.

Andrieu-Abadie N; Levade T (2002) **Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis**. Biochim. Biophys Acta 1585, 126-134.

Becerril V. 2004 **El mundo complejo del cáncer**. Monografía.

Bettaieb, A., Plo, I., Mansat-De Mas, V., Quillet-Mary, A., Levade, T., Laurent, G. and Jaffrezou, J.P. (1999) **Daunorubicin- and mitoxantrone-triggered phosphatidylcholine hydrolysis: implication in drug-induced ceramide generation and apoptosis**. Mol. Pharmacol. **55**, 118–125

Blazquez, C., Galve-Roperh, I. and Guzman, M. (2000) **De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase**. FASEB J. **14**, 2315–2322

Bollinger CR; Teichgräber V; Gulbins E (2005) **Ceramide-enriched membrane domains**. Biochim. Biophys. Acta 1746, 284-294.

Brown DA, London E, (2000) **Structure and Function of Sphingolipid and Cholesterol-rich Membrane Rafts**. J. Biol Chem 275: 17221-4.

Carracedo A; Lorente M; Egia A; Blazquez C; Garcia S; Giroux V; Malicet C; Villuendas R; Gironella M; González-Feria L; Piris MA; Iovanna JL; Guzmán M; Velasco G (2006) **The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells**. *cáncer Cell* 9, 301-312.

Chalfant, C.E., Rathman, K., Pinkerman, R.L., Wood, R.E., Obeid, L.M., Ogretmen, B. and Hannun, Y.A. (2002) **De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1**. J. Biol. Chem. **277**, 12587–12595

Chmura SJ, Nodzenski E, Beckett MA, Kufe DW, Quintans J and Weichselbaum RR (1997b) **Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis**. *Cancer Res* **57**: 1270-1275

Chmura, S.J., Nodzenski, E., Kharbanda, S., Pandey, P., Quintans, J., Kufe, D.W. and Weichselbaum, R.R. (2000) **Down-regulation of ceramide production abrogates ionizing radiation-induced cytochrome c release and apoptosis.** *Mol. Pharmacol.* **57**, 792–796

Chun, J., Byun, H. and Bittman, R. (2003) **First asymmetric synthesis of 6-hydroxy-4-sphinganine-containing ceramides. Use of chiral propargylic alcohols to prepare a lipid found in human skin.** *J. Org. Chem.* **68**, 348–354.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M (2005). **"Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors"**. *Lancet* **366** (9499): 1784–93.

Datta, S.C. and Radin, N.S. (1988) **Normalization of liver glucosylceramide levels in the 'Gaucher' mouse by phosphatidylserine injection.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 155–160.

Devlin, T. M. (2004) **Bioquímica**, 4ª edición. Reverté, Barcelona. ISBN 84-291-7208-4

Dillehay D. L., Webb S. J., Schmelz E.-M., Merrill A. H., Jr **Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice.** *J. Nutr.* 1994;124:615-620

Dolmans, DE; Fukumura D, Jain RK (May 2003). **"Photodynamic therapy for cancer"**. *Nat Rev Cancer* **3** (5): 380–7. doi:10.1038/nrc1071. PMID 12724736

Duke R, Ojcius D, y Young D. (1996) **Cell suicide in health and disease.** *Sci. Amer* 52:48-52

Ensminger A. H., Ensminger M. E., Konlade J. E., Robson J.R.K. (1994) **The Concise Encyclopedia of Food and Nutrition.** 384-469 CRC Press Boca Raton, FL.

Fodde R, Smits R (2002). **"Cancer biology" A matter of dosage.** *Science* **298** (5594): 761–3.

Furtherman AH; Hannun YA (2004) **The complex life of simple sphingolipids.** *EMBO reports.* 5, 777-782.

Frech KJ y col. (2006) **Antitumor activity of shingosine kinasa inhibitors.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*

Garcia A; Cayla X; Guernon J; Dessauge F; Hospital V; Rebollo MP; Fleischer A; Rebollo A (2003) **Serine/Threonine phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis.** Biochimie 85, 721-726.

Garzotto M., White-Jones M., Jiang Y., Ehleiter D., Liao W. C., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R. (1998) **12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis in LNCaP is mediated through ceramide synthase.** Cancer Res., 58: 2260-2264,

Garzotto, M., Haimovitz-Friedman, A., Liao, W.C., White-Jones, M., Huryk, R., Heston, W.D., Cardon-Cardo, C., Kolesnick, R. and Fuks, Z. (1999) **Reversal of radiation resistance in LNCaP cells by targeting apoptosis through ceramide synthase.** Cancer Res. **59**, 5194-5201

Gomez G. Zentella A, (2000) **Apoptosis y muerte celular programada.** UNAM. BEB 17(3)105-114

Gómez-Muñoz A; Frago LM; Alvarez L; Varela-Nieto I (1997) **Stimulation of DNA síntesis by natural ceramide 1-phosphate.** Biochem. J. 325, 435-440.

Gómez-Muñoz, 2004 A. (2004) **Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation.** FEBS Lett. 562, 5-10.

Gozani O, Óbice M, Yoo L, Karuman P, Yuan J. (2002) **Life and death in paradise.** Nature Cell Biol. 4:E159-E162.

Gregory CD. (2000) **CD-14-dependent clearance of apoptotic cells: relevante to the immune system.** Curr Opin Immunol 12:27-34.

Curtis H y Barnes MH (2000). **Biología** 6º Edición, Editorial Médica Panamericana pag. 273, 274.

Haimovitz-Friedman A., Kolesnick R. N., Fuks Z. (1996) **Modulation of the apoptotic response: potential for improving the outcome in clinical radiotherapy.** Semin. Radiat. Oncol., 6: 273-283,

Hanahan D, Weinberg RA (2000). **"The hallmarks of cancer".** Cell **100** (1): 57-70.

Heinrich M; Wickel M; Winoto-Morbach S; Schneider-Brachert W; Weber T; Brunner J Saffig P; Peters C; Kronke M; Schutze S (2000) **Ceramide as an activator lipid of cathepsin D.** Adv. Exp. Med. Biol. 477, 305-315.

Huwiler A; Johansen B; Skarstad A; Pfeilschifter J (2001) **Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and**

facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. FASEB J. 1636, 159-168.

Huwiler A; Xin C; Brust AK; Briner VA; Pfeilschifter J (2004) **Differential binding of ceramide to MEKK1 in glomerular endothelial and mesangial cells.** *Biochim. Biophys Acta.* 1636, 159-168.

Jensen R. G. eds. Handbook of Milk Composition 1995 Academic Press New York, NY.

Kolesnick R (1994) **Signal transduction through the sphingomyelin pathway.** *Mol Chem Neuropathol* **21**: 287-297.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche M. (1998) **The mitochondrial death/live regulator in apoptosis and necrosis.** *Annu Rev. Physiol* 60,619-42.

Kyprianou N., King E. D., Bradbury D., Rhee J. G. (1997) **bcl-2 overexpression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells.** *Int. J. Cancer*, 70: 341-348.

Sanchez-Torres L.E y Diosdado-Vargas F. (2003). **Apoptosis: El fenómeno y su determinación.** *Tec. Pecu. Mex* 41:49-62

Lavie Y; Cao H; Volner A; Lucci A; Han T; Geffen V; Giuliano A and Cabot M. (1997) **Agent that Reverse Multidrug Resistance, Tamoxifen, Verapamil and Cyclosporin A, Block Glycosphingolipid Metabolism by Inhibiting ceramide glycosylation in Human Cancer Cells.** *J. Biol. Chem.* 272, 1682-1687.

Lavie Y; Cao; Bursten S; Giuliano A and Cabot M. (1996) **Accumulation of Glucosylceramides in Multidrug-resistant Cancer Cells.** *J. Biol. Chem.* 271. 19530-19536.

Le Stunff, H., Galve-Roperh, I., Peterson, C., Milstein, S. and Spiegel, S. (2002) **Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis.** *J. Cell Biol.* **158**, 1039–1049

Liu B, Obeid LM and Hannun YA (1997) Sphingomyelinases in cell regulation. *Semin Cell Dev Biol* **8**: 311-322.

Liu, B., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Zhang, P., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (1998) **Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor- α -induced cell death.** *J. Biol. Chem.* **273**, 11313–11320

Lucci, A., Han, T.Y., Liu, Y.Y., Giuliano, A.E. and Cabot, M.C. (1999) **Modification of ceramide metabolism increases cancer cell sensitivity to cytotoxics.** *Int. J. Oncol.* **15**, 541–546

M.O. Hengartner (2000). **The biochemistry of apoptosis.** *Nature* 407: 770-776

Maceyka M; Sankala H; Hait NC; Le Stunff H; Liu H; Toman R; Collier C; Zhang M; Satin LS; Merrill Jr AH; Milstien S; Spiegel S (2005) **SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism.** *J. Biol. Chem.* 280, 37118-37129.

Marchesini N; Hannun YA (2004) **Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanism of regulation.** *Biochem. Cell Biol.* 82, 27-44.

Merrill A. H., Jr, Lingrell S., Wang E., Nikolova-Karakashian M., Vales T. R., Vance D. E. (1995) **Sphingolipid biosynthesis de novo by rat hepatocytes in culture. Ceramide and sphingomyelin are associated with, but not required, for very low density lipoprotein secretion.** *J. Biol. Chem.* 270:13834-13841

Morabia A (2004). **A History of Epidemiologic Methods and Concepts.** Boston: Birkhauser, 301-302. ISBN 3-7643-6818-7. Retrieved on 2007-12-31.

Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA (2006). **"Clonal origin and evolution of a transmissible cancer".** *Cell* **126** (3): 477–87.

Nagata S. (1999). **Fas Ligand-induced apoptosis.** *Annu Rev. Genet* 33:29-55.

Radin N. 2003. **Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs.** *Biochem. J.* **371** (243–256)

Nyberg L., Duan R.-D., Axelson J., Nilsson Å. (1996) **Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile.** *Biochim. Biophys. Acta* 1300:42-48

Page C. Curtis M. et al (1998). **Farmacología Integrada** Harcourt. Brace. Madrid Pag. 501-522.

Radin, N.S. (2003) **Designing anticancer drugs via the Achilles heel: ceramide, allylic ketones, and mitochondria.** *Bioorg. Med. Chem.*, in the press

Raggers, R.J., van Helvoort, A., Evers, R. and van Meer, G. (1999) **The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane.** J. Cell Sci. **112**, 415–422

Royai R., Lange P. H., Vessella R. (1996) **Preclinical models of prostate cancer.** Semin. Oncol., **23**: 35-40.

Ruvolo PP (2003) **Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites.** Pharmacol. Res. **47**, 383-392.

Sanchez T; Hla T; (2004) **Structural and functional characteristics of S1P receptors.** J. Cell Biochem. **92**, 13-22.

Schmelz E.-M., Dombrink-Kurtzman M. A., Roberts P. C., Kozutsumi Y., Kawasaki T., Merrill A. H., Jr (1998) **Induction of apoptosis by Fumonisin B1 in HT-29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases.** Toxicol. Appl. Pharmacol. **148**:252-260

Senchenkov, A., Litvak, D.A. and Cabot, M.C. (2001) **Targeting ceramide metabolism—a strategy for overcoming drug resistance.** J. Natl. Cancer Inst. **93**, 347–357

Simstein R; Burow M; Parker A; Weldon C. and Beckman B. (2003). **Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System.** Experimental Biology and Medicine **228**:995-1003.

Siskind LJ; Kolesnick RN; Colombini M (2006) **Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations.** Mitochondrion ,1-8.

Subbaiah PV; Horvath P; Achar SB (2006) **Regulation of the activity and fatty acid specificity of lecithin-cholesterol acyltransferase by sphingomyelin and its metabolites, ceramide and ceramide 1-phosphate.** Biochemistry **45**, 5029-5038.

Tapia Hernandez V. M. (2003) **participación de los esfingolípidos en la prevención de la transformación oncogénica.** FES-Iztacala. UNAM.

Thome M, Tschopp J. **Regulation of lymphocyte proliferation and by FLIP.** Nature **1**:50-54

Vázquez C. 2003. **Los lípidos.** Bioquímica y biología molecular. Instituto de química UNAM.

Vescovo, G., Ravara, B., Gobbo, V., Sandri, M., Angelini, A., Della Barbera, M., Dona, M., Peluso, G., Calvani, M., Mosconi, L. and Dalla Libera, L. (2002) **I-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure.** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C802–C810

Vesper, H., Schmelz, E.M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V. and Merrill, Jr, A.H. (1999) **Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition.** *J. Nutr.* **129**, 1239–1250

Vieu, C., Terce, F., Chevy, F., Rolland, C., Barbaras, R., Chap, H., Wolf, C., Perret, B. and Collet, X. (2002) **Coupled assay of sphingomyelin and ceramide molecular species by gas liquid chromatography.** *J. Lipid Res.* **43**, 510–522

Voet, D (1992) “**bioquímica**” Edt. Omega S.A Primera edc. Barcelona, España Pág. 1161-1165-1168.

Ward J. F. **The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences.** *Int. J. Radiat. Biol.*, 66: 427-442, 1994.

Whitaker B. D. **Cerebrosides in mature-green and red-ripe bell pepper and tomato fruits.** *Phytochemistry* 1996;42:627-632

Wieder, T., Orfanos, C.E. and Geilen, C.C. (1998) **Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine.** *J. Biol. Chem.* **273**, 11025–11031

Weidner N, Semple J, Welch W, and Folkman J; (1991) **Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma**; *The New England Journal of Medicine*, Volume 324:1-8, January 3; Number 1.

Wijesinghe DS; Massiello A; Subramanian P; Szulc Z; Bielawska A; Chalfant CE (2005) **Substrate specificity of human ceramide kinase.** *J. Lipid Res.* **46**, 2706-2716.