



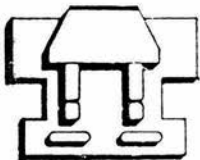
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
I Z T A C A L A

"PARTICIPACION DE LOS ESFINGOLIPIDOS EN LA
PREVENCION DE LA TRANSFORMACION ONCOGENICA".

T E S I N A
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
VICTOR MANUEL TAPIA HERNANDEZ

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



I Z T A C A L A

MARZO, 2003



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.

ESTA TESINA SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA,
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES,
PERTENECIENTE A LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
INTERDISCIPLINARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA
EDUCACIÓN EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA. UNAM.

BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. EN C. DAVID SEGURA COBOS.

AGRADECIMIENTOS

PRINCIPALMENTE A DIOS.

A ti que me diste la dicha de ver realizado uno de mis más grandes sueños y por darme la fuerza para seguir siempre hacia adelante guiándome y levantándome en cada tropiezo que di. Guarda mi corazón cerca de ti y ayúdame a ejercer dignamente mi profesión.

AL M. EN C. DAVID SEGURA COBOS.

Por todo el apoyo que me brindó durante todo el escrito, por ser además un buen maestro y sobre todo un buen amigo. **"GRACIAS PROF."**

A LA DRA. BEATRIZ VÁZQUEZ CRUZ.

Por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio que está a su cargo, por su amistad y confianza brindada durante este tiempo.

A LA M. EN C. ROCIO BAUTISTA PÉREZ Y A LA BIÓLOGA
SUSANA ESTHER GONZÁLEZ ALMAZÁN.

Por su apoyo, comentarios, sugerencias y por su tiempo invertido en la realización de este trabajo.

A LA M. EN C. GLORIA LUZ PANIAGUA Y AL M. EN C. ERIC
MONROY.

Por ayudarme en la realización de este escrito, por aconsejarme en seguir siempre adelante, por todas sus enseñanzas y por brindarme una sincera amistad desde que los conocí **"GRACIAS PROFESORES"**.

A LA FAMILIA SANTILLÁN REYES.

Por alentarme a seguir siempre hacia delante en especial a **CESAR Y LUIS** (hermanos del alma) que siempre han creído en mí y a sus papas por soportarme todo este tiempo, en fin, a toda la familia **"MUCHAS GRACIAS"**.

A CRISTINA MEZA.

Por creer en mí y en mi capacidad para poder terminar mi carrera, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por motivarme a terminar mi carrera y por ser una persona especial y muy valiosa **"GRACIAS CRIS."**

A ELIZABETH AZUA.

Por apoyarme, por hacerme comprender que valgo mucho como persona y aconsejarme que nunca debo de retroceder ante los problemas y por ser una persona especial con la sonrisa pintada **"GRACIAS ELI"**.

A MI TÍA AURELIA Y SU FAMILIA.

Gracias, por darme todo el apoyo que pudiste. eres una muy buena persona tía y te admiro y respeto por ser lo que eres, gracias primos por comprenderme y compartir mis alegrías.

A MI MAMA Y A MIS HERMANOS.

Por tenerme confianza en las cosas que he decidido y por brindarme el cariño que siempre me han tenido a través de todos estos años y porque han sido un motivo para terminar este trabajo **"GRACIAS FAMILIA"**.

A MI PADRE.

Por enseñarme a ser un hombre de trabajo para solventarme por mí mismo **"GRACIAS"**

Gracias a todas las personas que me apoyaron, porque siempre ocuparán un espacio en mi pensamiento y gracias a las que no lo hicieron porque me motivaron aún más.

DEDICATORIA

A MI NOVIA LAURA PÉREZ IGLESIAS.

Por caminar siempre a mi lado y ser el motivo más grande e importante para seguir siempre de frente, por ser inspiración de grandeza y sueños hechos realidades, por confiar siempre en mí y por todo lo que soy hasta el día de hoy **"MIL GRACIAS FLACA"**.

A MIS SUEGROS (LAURO P. Y SOCORRO I.).

A quienes quiero y respeto por ser unas personas muy amables, dignas de admiración, por ser un ejemplo a seguir y por apoyarme en todo lo que han podido **"Gracias a ustedes y a toda su familia."**

A MIS HERMANAS.

Por impulsarme a seguir siempre hacia adelante y por creer siempre en mí (ALE Y MAGO) ustedes siempre ocuparan un lugar muy especial en mi corazón por el simple hecho de ser mis hermanas, las quiero mucho **"GRACIAS HERMANAS"**.

A LUIS SANTILLÁN REYES

Por alegrar la vida de toda la gente incluyendo la mía, porque aunque ya no estés entre nosotros siempre te voy a recordar como lo que fuiste para mí **"un buen amigo"**. Que dios te guarde para siempre y que algún día nos brinde un poquito



DEDICATORIA

A MI NOVIA LAURA PÉREZ IGLESIAS.

Por caminar siempre a mi lado y ser el motivo más grande e importante para seguir siempre de frente, por ser inspiración de grandeza y sueños hechos realidades, por confiar siempre en mí y por todo lo que soy hasta el día de hoy **"MIL GRACIAS FLACA"**.

A MIS SUEGROS (LAURO P. Y SOCORRO I.).

A quienes quiero y respeto por ser unas personas muy amables, dignas de admiración, por ser un ejemplo a seguir y por apoyarme en todo lo que han podido **"Gracias a ustedes y a toda su familia."**

A MIS HERMANAS.

Por impulsarme a seguir siempre hacia adelante y por creer siempre en mí (ALE Y MAGO) ustedes siempre ocuparan un lugar muy especial en mi corazón por el simple hecho de ser mis hermanas, las quiero mucho **"GRACIAS HERMANAS"**.

A LUIS SANTILLÁN REYES

Por alegrar la vida de toda la gente incluyendo la mía, porque aunque ya no estés entre nosotros siempre te voy a recordar como lo que fuiste para mí **"un buen amigo"**. Que dios te guarde para siempre y que algún día nos brinde un poquito de tu cielo.

*Cada mañana, en
el África,
una gacela se
despierta; sabe
que deberá correr
más rápido
que el león, o éste
la matará.*

*Cada mañana, en
el África,
Un león se
despierta; sabe
que deberá correr
más rápido
que la gacela, o
morirá de
hambre.*

*Cada mañana,
cuando sale
el sol, no importa
si eres un
león o una
gacela; mejor será
que te pongas a
correr.*

*La vida no es ningún pasillo recto y fácil
que recorreremos libres y sin obstáculos,
sino un laberinto de pasadizos,
en el que tenemos que buscar nuestro camino,
perdidos y confusos, detenidos,
de vez en cuando, por un callejón sin salida.*

*Pero, si tenemos fe, siempre se abre
una puerta ante nosotros;
quizá no sea la que imaginamos,
pero sí será, finalmente,
la que demuestre ser buena
para nosotros.*

A. J. CRONIN
INDICE



Cada mañana, en
el África,
una gacela se
despierta; sabe
que deberá correr
más rápido
que el león, o éste
la matará.

Cada mañana, en
el África,
Un león se
despierta; sabe
que deberá correr
más rápido
que la gacela, o
morirá de
hambre.

Cada mañana,
cuando sale
el sol, no importa
si eres un
león o una
gacela; mejor será
que te pongas a
correr.

*La vida no es ningún pasillo recto y fácil
que recorremos libres y sin obstáculos,
sino un laberinto de pasadizos,
en el que tenemos que buscar nuestro camino,
perdidos y confusos, detenidos,
de vez en cuando, por un callejón sin salida.*

*Pero, si tenemos fe, siempre se abre
una puerta ante nosotros;
quizá no sea la que imaginamos,
pero sí será, finalmente,
la que demuestre ser buena
para nosotros.*

A. J. CRONIN

A. RESUMEN

IZT.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1. Ciclo celular.

1.1.1. Los pasos del ciclo celular.

1.2. Interfase y división.

1.3. El ciclo celular y la apoptosis.

1.3.1. Ciclinas.

1.3.2. Control de progresión del ciclo celular

1.3.3. Regulación del ciclo celular: la vía p53-retinoblastoma

1.3.4. Desregulación del ciclo celular: desarrollo de cáncer.

1.4. Células cancerosas

1.4.1. Definición de cáncer

1.5. Aneuploidia

1.5.1. Aneuploidía y células cancerosas

1.5.2. Cáncer y factores de crecimiento.

1.5.3. Los cánceres difieren en concordancia con el tipo celular del que derivan.

1.5.4. Muchos cánceres derivan de una célula anormal

1.6. Apoptosis.

1.7. Lípidos.

1.7.1. Participación de moléculas lipídicas en la señalización celular.

1.8. Esfingolípidos.

1.9. La ceramida induce apoptosis.

1.10. Actividad de la sintasa de esfingomielina.

1.11. Actividad de la sintasa de la glucosilceramida.

II .CONCLUSIÓN.

III. BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

Ácido fosfatídico	(PA)
Células endoteliales de la vena umbilical humana	(HUVECs)
Ceramida	(Cer)
Coenzima A	(CoA)
Diacilglicerol	(DAG)
Esfingomielina	(SM)
Esfingomielinasas	(Smasas)
Esfingomielinasa bacteriano	(bSMasa)
Esfingosina	(Sph)
Esfingosina 1-fosfato	(Sph-1-P)
Factor activador de plaquetas	(PAF)
Factor nuclear κ B	(NF- κ B)
Factor promotor de la fase M	(MPF)
Factor- α tumor necrotico	(TNF- α)
Fosfatidilcolina	(PC)
Fosfatidilinositol bifosfato	(PIP ₂)
Fosfolipasa del ácido fosfatídico	(PAP)
Fosfolipasa D	(PLD)
Glucosliceramida	(GlcCer)
Glucosliceramida sintasa	(GCS)
Inositol trifosfato	(IP ₃)
Mitosis	(M).
Multirresistencia a fármacos	(MDR)
Proteína cinasa C	(PKC)
Retinoblastoma	(Rb)
Síntesis	(S)
1-fenil-2-palmitoilamino-3-morfolino-1-propanol	(PPMP)

RESUMEN.

Durante los últimos 25 años el conocimiento de las alteraciones genéticas que tienen lugar en las células cancerosas ha posibilitado una mejor comprensión de los procesos que son responsables de la transformación de las células normales en cancerosas.

Cuanto mayor sea nuestro conocimiento de los mecanismos por los que una célula normal controla su proliferación y cómo se pierde este control en las células tumorales, y de aquellos que regulan la invasividad de las células cancerosas o de los que son responsables de que éstas escapen a la destrucción por el sistema inmune del organismo es evidente que estaremos más cerca de encontrar fármacos y tratamientos que permitan inhibir la aparición y/o el crecimiento de los cánceres.

La glucosilceramida se asocia con la resistencia a la quimioterapia en las células tumorales. De hecho la acumulación de la glucosilceramida es una característica de las células con multirresistencia a fármacos (MDR) y tumores como el melanoma y el cáncer de seno obtenidos de pacientes que responden menos a la quimioterapia. Además estudios recientes muestran que el mantenimiento de los niveles de glucosilceramida en células MDR es importante para prevenir la apoptosis (Hannun, y Argraves, 2001).

Durante el proceso de transformación existe elevada actividad de la enzima esfingomielina sintetasa y esta actividad esta asociada con la activación del factor de transcripción $\text{Nf-}\kappa\text{B}$.

Las células de hematoma y de fibroblastos transformados tienen un alto nivel de la sintetasa de esfingomielina, una actividad casi ausente en los fibroblastos normales y muy baja en células hepáticas normales (Pyne y col., 1997).

sino un breve periodo del ciclo reproductivo celular, el denominado fase M(Mitosis).

El tiempo mucho más largo que transcurre entre una fase M y la siguiente se conoce como interfase. A través del microscopio la interfase aparece, de manera decepcionante, como un interludio tranquilo durante el cual la célula se limita a aumentar lentamente su volumen. El uso de técnicas más sofisticadas revela que la interfase es de hecho un periodo en el que se suceden en una secuencia cuidadosamente ordenada los complejos preparativos necesarios para la división (Alberts, 1996).

Las cuatro fases sucesivas del ciclo celular eucariótico típico. Después de la fase M, que consiste en la división nuclear (mitosis) y la división citoplasmática (citocinesis), las células hijas inician la interfase de un nuevo ciclo. La interfase comienza con la fase G₁, en la que las células, cuyas actividades biosintéticas.

INTERFASE Y DIVISIÓN.

La vida de las células transita por dos etapas que se alternan cíclicamente: interfase y división, la interfase se subdivide en tres periodos G₁, S y G₂.

G₁: en esta fase tienen lugar las actividades de la célula: secreción, conducción, endocitosis, etc. Comenzando a partir de la citocinesis de la división anterior, la célula hija tiene bajo contenido de ATP resultante del gasto experimentado en el ciclo anterior, por lo que en este periodo se produce la acumulación de ATP necesario y el incremento de tamaño celular.

Las células que no se dividen nuevamente (como las nerviosas o del músculo esquelético) pasan toda su vida en este periodo, que en este caso se llaman G₀, ya que las células se retiran del ciclo celular.

S: fase de síntesis y replicación del DNA, comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente y el ATP necesario. Dado que el ADN lleva la información genética de la célula, antes de la mitosis debe generarse dos moléculas idénticas para ser repartidas entre las dos células hijas. Durante la interfase el

ADN asociado a las histonas constituye la cromatina. El ADN es una doble hélice que se abre y cada cadena es usada como molde para la producción de una nueva cadena, que queda unida a la original usada como molde. Por esta razón la replicación del ADN se denomina Semiconservativa. Estos ADN's nuevos quedan unidos por el centrómero hasta la mitosis, recibiendo el nombre de cromátidas hermanas.

G2: Es el tiempo que transcurre entre la duplicación del ADN y el inicio de la mitosis. Dado que el proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía la célula entra nuevamente en un proceso de crecimiento y adquisición de ATP, la cual utiliza para el proceso de mitosis.

R: fase tardía de G1, la célula decide si debe o no seguir el ciclo celular (Alberts, 1996).

EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS

Células en activa división celular pueden encontrarse en una de cuatro etapas del ciclo celular. El período G1 (Gap 1), intervalo entre la mitosis y la replicación del ADN, se caracteriza por el crecimiento celular. En G1 existe un momento crítico en el que la célula puede salir o entrar al reposo proliferativo G₀. La prosecución de G1 depende de la presencia de señales favorables como mitógenos o factores de crecimiento. Entonces en presencia de estas señales la célula entrara en la fase S (síntesis) en donde ocurrirá la replicación del ADN. A este período le sigue la fase G2 (Gap 2) durante la cual ocurren grandes cambios en la arquitectura celular como la ruptura de la membrana nuclear, la condensación de la cromatina y la reorganización del citoesqueleto. El ciclo celular culmina con la segregación de los cromosomas duplicados en las células hijas durante la fase M (mitosis) (Lehninger, 1995).

Ciclinas.

Proteínas sintetizadas continuamente durante la interfase y degradadas súbitamente por enzimas al final de cada mitosis. Durante el ciclo celular su concentración fluctúa. Y al hacerlo actúan como reguladores de la actividad enzimática de las cinasas.

La ciclina al igual que el factor promotor de la fase M (MPF), pertenece al pequeño grupo de proteínas cuya actividad depende marcadamente de la fase del ciclo de división en la que se halle la célula. La ciclina se sintetiza a un ritmo rápido y consta a lo largo del ciclo, pero en la mitad de la fase M es súbitamente destruida. Así, en cada ciclo celular su concentración aumenta constantemente desde cero para luego, de repente, caer de nuevo a cero. Los genes de la ciclina han sido clonados, lo cual ha permitido preparar mRNA de ciclina puro. Cuando este mRNA se inyecta en un oocito de *Xenopus* tiene el mismo efecto de MPF, sacando al oocito de la fase G₂ y deduciéndolo a la fase M.

A partir de estas y otras observaciones se ha sugerido que el pico de MPF que se produce en la fase M podría estar desencadenado por el aumento de concentración de ciclina por encima de cierto umbral; la destrucción de ciclina está causada por un acontecimiento de la fase M, y la subsiguiente desaparición de MPF podría ser consecuencia de la destrucción de la ciclina.

Control de progresión del ciclo celular

Los organismos multicelulares poseen sofisticados mecanismos que controlan la progresión del ciclo celular y por lo tanto la proliferación celular. Ante situaciones desfavorables como, falta de nutrientes, daño celular, ausencia de mitógenos, etc, la célula se asegura de frenar el ciclo celular. La progresión en el ciclo celular se lleva a cabo por un número limitado de proteínas reguladoras denominadas ciclinas. La progresión a través de G₁-S-G₂ depende de la síntesis apropiada de ciclinas en momentos específicos de cada una de estas

fases. El complejo ciclina-Cdk es activado a su vez por pasos secuenciales de fosforilación y defosforilación en residuos claves de las cinasas. La actividad de las cdk puede ser específicamente inhibida por ciertas proteínas. Las cdk activan o inhiben diversas proteínas de modo de coordinar eventos como replicación del ADN o ruptura de la membrana nuclear (Alberts, 1996).

Regulación del ciclo celular: la vía p53-retinoblastoma

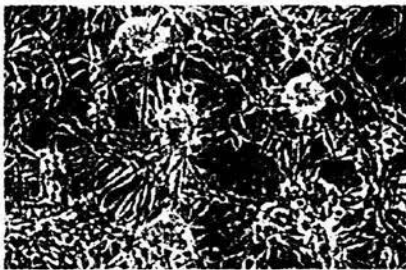
La entrada a la fase G1 está limitada por la presencia de la proteína retinoblastoma (Rb) que une y secuestra al factor transcripcional E2F, el que controla la síntesis de proteínas necesarias en G1. Esta inhibición desaparece cuando la cdk-4 se activa y fosforila a Rb activándose la capacidad transactivante de E2F. La presencia de mitógenos reduce los niveles de la proteína p16 inhibidora de la cdk-4 y a su vez induce la aparición de ciclina D, acciones que aumentan la actividad cdk-4. Uno de los sustratos más importantes de esta cinasa es la proteína retinoblastoma (Rb). La cdk-4 hiperfosforila a Rb liberando el factor transcripcional E2F. Este se une a secuencias específicas del ADN para promover la síntesis de enzimas requeridas en la síntesis del ADN (Polimerasas, Dehidrofolato reductasa y ciclinas E y A). La aparición de la ciclina E permite la activación de cdk2 que promueve la desaparición de su inhibidor p27 a través de fosforilación y activa la maquinaria de replicación. Luego si se ha completado la etapa S, la célula durante G2 se prepara para la división celular mediante la activación de cdk1 dependiente de ciclina A y B. La cdk1 es activada por fosforilación del residuo de Thr-14 y defosforilación de tyr-1. La actividad concertada de estas ciclinas permite la desintegración de la membrana nuclear, aparición del huso mitótico y cariocinesis. Fallas en la replicación del ADN activan el denominado guardián celular p53 que entre sus numerosas funciones actúa como factor transcripcional estimulando la síntesis de la proteína p21. La P21 es un inhibidor del complejo cdk-4/D y así p53 detiene la progresión el ciclo celular dando

tiempo a la célula para reparar el ADN dañado. El p53 se autorregula mediante un mecanismo de retroalimentación negativo al inducir la síntesis de la proteína mdm2. La Mdm2 secuestra a p53 y lo transporta fuera del núcleo, facilitando su destrucción. Si el daño del ADN no se puede reparar en un tiempo prudente, la célula activa mecanismos de autodestrucción (Voet, 1992).

Desregulación del ciclo celular: desarrollo de cáncer.

El tejido neoplásico se caracteriza por una división celular rápida, descontrolada. La vía p53-ciclinaD-cdk4-Rb es central en la regulación de la transición G1/S y ha ayudado a comprender la génesis de diversos cánceres humanos en distintos tipos de cáncer se ha observado alteraciones en los niveles o actividad de proteínas de esta vía. Por ejemplo se encuentra una sobreexpresión de ciclina D, mutación en cdk4 que la hace insensible a p16, o también mutación en Rb que permite la activación persistente de E2F o mutaciones en p53 que lo incapacita para detener el ciclo celular (Voet, 1992).

CÉLULAS CANCEROSAS



Una célula cancerosa es el resultado de un cambio genético permanentemente producida en una célula somática por lo demás normal. Tal cambio, denominado transformación maligna, puede ser desencadenado por algún agente físico externo, como los rayos X, por un exceso de radiación ultravioleta de la luz solar, o por varios agentes químicos carcinogénicos. Las células cancerosas tienden a crecer de un modo bastante agresivo y no obedecen a los esquemas normales de formación de los tejidos. Su modo anormal de crecer, que no es necesariamente masivo, pero que de

ordinario es disruptivo, tiende a interferir con las actividades normales de las células y tejidos adyacentes (Lehninger, 1995).

Definición de cáncer

Antes de pasar a definir el término cáncer conviene explicar brevemente que las células de la mayor parte de los tejidos del organismo tienen la capacidad de reproducirse. Algunas lo hacen constantemente y otras solo en ciertas circunstancias. Por ejemplo, las células de la parte más profunda de la piel siempre se están multiplicando. Las hijas de estas células van siendo empujadas hacia afuera, desde donde eventualmente se desprenden. Sin embargo, en caso de que la persona sufra una cortadura en la piel, la velocidad con la que esas células se reproducen aumenta, para reparar pronto el daño.

Existen mecanismos que regulan la velocidad con la que las células mencionadas deben reproducirse. En otros tejidos distintos a la piel hay mecanismos que solamente permiten la reproducción celular en ciertas circunstancias, como cuando hay necesidad de reparar algún daño. El resto del tiempo el número de células de ese tipo en ese tejido es estable.

Cuando una célula pierde la capacidad para que su reproducción pueda ser regulada por esos mecanismos surge un tumor. En el caso de los tumores malignos las células adquieren también otras características que las hacen más peligrosas, como la capacidad de desprenderse del sitio donde se originaron y viajar a través de la circulación sanguínea o linfática a órganos distantes para ahí continuar reproduciéndose y formar nuevos tumores (que se puede decir que son "hijos" del tumor original o primario), conocidos como metástasis.

Una vez explicado lo anterior podríamos definir al cáncer como la proliferación desordenada de células que adquieren la capacidad de invadir otros tejidos, de enviar metástasis a distancia, y eventualmente, de matar al huésped (enfermo).

Las células cancerosas presentan un tipo distinto de metabolismo, aunque poseen todas las enzimas requeridas para la mayoría de las rutas metabólicas centrales, casi todos los tipos de células cancerosas muestran una anomalía de la integración de la secuencia glucolítica con el ciclo de los ácidos



tricarboxílicos. El ritmo de consumo de oxígeno de las células cancerosas es algo inferior a los valores correspondientes de las células normales. Sin embargo, las células malignas tienden a utilizar de 5 a 10 veces más de glucosa que los tejidos normales, y la mayor parte de ella la convierten en lactato, a pesar de que poseen un ritmo respiratorio normal. Este fenómeno de producción aeróbica de lactato se denomina glucólisis aeróbica.

Las células cancerosas muestran muchos cambios en las propiedades de la superficie celular. Son características de un cáncer un crecimiento incontrolado, la invasión de otros tejidos y la diseminación a otros sitios del organismo por metástasis.

Todas ellas indican que la célula cancerosa, en cierta forma, escapa al control que normalmente regula el crecimiento celular. En este sentido es interesante que muchos de los cambios que se observan estén relacionados con alteraciones de la membrana y especialmente de la cubierta celular.

IZT.

1.- Inhibición de movimiento por contacto.- Las células normales que crecen en un cultivo de tejido tienden a establecer contactos celulares con las células vecinas. En los puntos de adherencia aparece una especie de placa densa; al mismo tiempo, el movimiento de las prolongaciones celulares se hace más lento y se produce su inhibición. Por el contrario, las células cancerosas no se adhieren y no muestran este tipo de inhibición por contacto. En estas células hay un mayor número de prolongaciones en la superficie celular y los movimientos son más intensos. Estas diferencias en el movimiento están acompañadas por cambios en los microfilamentos.

2. Inhibición de mitosis por contacto.- Una célula normal en cultivo se divide cada 24 horas mientras flota libremente en el medio. Sin embargo, cuando se pone en estrecho contacto en una monocapa, la velocidad de las mitosis disminuye y hay una inhibición de la división celular.

La inhibición depende de alguna señal desconocida que se produce cuando las células se ponen en contacto, y no de una sustancia difusible que actúa a distancia.

En las células cancerosas, colocadas en las mismas condiciones, no hay inhibición de la mitosis y en consecuencia, las células en cultivo tienden a apilarse formando masas de varias capas de espesor. Por otra parte, presentan menor adhesividad, tanto con respecto al sustrato sólido como entre sí, y su motilidad es mucho más pronunciada. Estas propiedades pueden explicar porqué las neoplasias invaden a otros tejidos y manifiestan un crecimiento descontrolado (Voet, 1992).

El crecimiento y reproducción de las células suelen ocurrir juntos; el crecimiento ocurre simultáneamente con la duplicación de los genes del núcleo, seguido unas horas más tarde de mitosis.

En el hombre normal, la regulación del crecimiento y la reproducción celulares es prácticamente un misterio. Sabemos que algunas células crecen y se reproducen constantemente como las formadoras de la sangre de la médula ósea, las capas germinativas de la piel y el epitelio del intestino. Pero muchas otras células del cuerpo no se reproducen durante años, como ocurre con algunas células musculares; y unas pocas células como las neuronas, no se reproducen en toda la vida.

Sabemos muy poco del mecanismo que conserva los números adecuados de los diferentes tipos celulares en la **economía** se admite que hay sustancias de control secretadas por las diferentes células que ejercen efecto de retroalimentación interrumpiendo o haciendo más lento su crecimiento cuando se han producido demasiados elementos, aunque sólo se han descubierto unas pocas de tales sustancias. Sabemos que las células de cualquier tipo extraídas del cuerpo y que crecen en cultivos de tejido pueden desarrollarse y reproducirse, rápida e indefinidamente si el medio en el cual vive se va cambiando constantemente. Pero dejarán de crecer si se deja que incluso

pequeñas cantidades de sus propias secreciones se acumulen en el medio, lo cual hace pensar que sustancias de control limitan el crecimiento celular.

Puede producirse cáncer en cualquier conjunto de la **economía**. Resulta de un cambio en algunas células que les permite no respetar los límites normales de crecimiento, no obedecer los controles de retroalimentación que normalmente interrumpen el crecimiento y reproducción celulares después que un número determinado de células ya se han desarrollado, como se dijo antes, incluso las células normales extraídas del cuerpo y creciendo en cultivos de tejido pueden desarrollarse y proliferar indefinitivamente si el medio de crecimiento cambia constantemente. Por lo tanto, en cultivos de tejido, las células normales se conducen exactamente como las cancerosas, pero en tejidos normales del cuerpo las células tienen una conducta diferente, ya que está sometida a límites, cosa que no ocurre con las cancerosas.

El tejido canceroso establece competencia con los tejidos normales para nutrientes; como las células cancerosas continúan proliferando indefinidamente su número se multiplica día a día, y puede comprenderse que las células cancerosas pronto captarán prácticamente todos los elementos nutritivos disponibles para el cuerpo. En consecuencia, los tejidos normales sufren gradualmente muerte nutritiva.

Dado el cambio que convierte una célula somática en una célula cancerosa es genético, las células cancerosas transmiten sus características asociales y agresivas a su descendencia, de modo que si el cáncer no se extirpa quirúrgicamente o se destruye de otra manera antes que haya crecido durante mucho tiempo, 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, y de esta manera las células cancerosas pueden dominar al cuerpo.

Al perder la capacidad para reaccionar a influencias que regulan el crecimiento de las células normales, las células cancerosas en cierto modo cumplen los requisitos de la inmortalidad de las células somáticas.

Las células de un cáncer suelen presentar aneuploidia; en realidad, el mostrar aneuploidia en células en desarrollo tomadas del cuerpo se consideran indicación positiva de que son cancerosas. Sin embargo, la falta de aneuploidia no descarta cáncer, pues algunas células cancerosas no son aneuploides, por lo menos no lo son inicialmente, sino sólo al continuar la multiplicación.

1.5. ANEUPLOIDIA

Se origina a nivel de células somáticas en dos estados. Las especies de animales superiores, como el hombre, se perpetúan indefinidamente porque las células germinativas crean nuevos individuos que conservan la especie. Considerando que los cuerpos compuestos por células somáticas tienen vida limitada, surge la interrogante de saber si hay o no un factor que limite la duración de la vida.

Una forma de investigar el problema de la inmortalidad de las células somáticas consiste en cultivarlos fuera del cuerpo en un medio adecuado. Estudios de esta clase han demostrado que las células somáticas con capacidad de proliferar pueden propagarse fuera del organismo en medios nutritivos tiempo suficiente para sugerir que pudieran seguir multiplicándose indefinidamente. Pero, al disponer de métodos de análisis cromosómicos también se tornó patente que la mayor de estas líneas de células que no mueren después de unos meses de cultivo *in vitro* sino siguen proliferando, han adquirido un número aneuploide de cromosomas y, por ello ya no pueden considerarse normales.

1.5.1. Aneuploidia y células cancerosas

Ocurre aneuploidia en circunstancias de multiplicación más o menos continuada de células que caracteriza a la enfermedad llamada cáncer. Se considera que el cáncer nace porque alguna célula somática experimenta cambio genético de modo que se multiplica en circunstancias en las cuales estaría restringida la multiplicación de células normales. El escape de las células cancerosas de los mecanismos que regulan el crecimiento se acompaña, más o menos recíprocamente, de pérdida de la capacidad para alcanzar la clase de estructura muy especializada que tendría células normales del mismo tipo y, como consecuencia, suelen ser menos eficaces funcionalmente o si acaso funcionan, la función no está regulada, como si no guardaran relación con las necesidades del resto del organismo; suele decirse que las células cancerosas utilizan su energía para crecer y no para funcionar.

1.5.2. Cáncer y factores de crecimiento.

Una de las áreas con mayor potencialidad benéfica de la investigación actual está encaminada hacia la comprensión de cómo las células ordinarias, de crecimiento normal, se transforman en células cancerosas de crecimiento descontrolado. Conocer esto en detalle requerirá bastante esfuerzo porque hay varios mecanismos relacionados con la conversión de células normales en células cancerosas; pero lo que ya resulta claro es que uno de los mecanismos está relacionado con ciertas sustancias polipeptídicas que imitan algún aspecto de la acción bioquímica de los factores de crecimiento naturales. Las sustancias que pertenecen a esta categoría, son proteínas representantes de las proteínas oncogénicas, es decir, sustancias carcinógenas sintetizada *in vivo* bajo el control de genes llamados oncogenes, los cuales están presentes de modo natural en el DNA de los cromosomas, pero en condiciones normales no se expresan.

Dos oncogenes asociados en fechas recientes con los factores de crecimiento son el *sis*-oncogén y el *erb*-oncogén. La proteína del *sis*-oncogén es muy semejante al factor de crecimiento derivado del plasma (PDGF), mientras que la de *erb*-oncogén se parece a la proteína membránica receptora del factor de crecimiento epidérmico.

1.5.3. Los cánceres difieren en concordancia con el tipo celular del que derivan.

Las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias: ellas y su progenie se reproducen a pesar de las restricciones normales y invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células. Una célula anormal aislada que no prolifere más que sus vecinas normales, no produce ningún daño significativo, sean cual sean las propiedades desagradables que pueda tener; pero si su proliferación está fuera de control, producirá un tumor o neoplasma una masa de células anormales creciendo inexorablemente. Sin embargo, las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, se dice que el tumor es benigno y generalmente puede conseguirse una curación completa extrayendo la masa quirúrgicamente. Un tumor se considera canceroso solo si es maligno, es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante. La capacidad invasora implica, generalmente, la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos, y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo. Los cánceres se clasifican de acuerdo con los tejidos que invaden y con el tipo celular en el que se originan. Los procedentes de las células epiteliales se denominan carcinomas; los procedentes de las células musculares se denominan sarcomas. Entre los cánceres que no encajan en ninguna de estas dos amplias categorías se encuentran las diversas formas de leucemia, derivadas de células hematopoyéticas, y los cánceres derivados de células del sistema nervioso.

1.5.4. Muchos cánceres derivan de una célula anormal

En muchos tipos de cánceres se puede seguir su evolución hasta llegar a su origen, un único tumor primario aislado; ello sugiere que derivan por división celular de una única célula la cual ha sufrido algún cambio hereditario que le permite crecer más que sus vecinas. Pero, cuando se detecta por primera vez, un tumor típico ya contiene mil millones de células o más, y a menudo incluye muchas células normales.

Generalmente las células cancerosas retienen muchas características del tipo celular específico del que ellas derivan. Se cree que la mayoría de los cánceres se originan a partir de una única célula que ha experimentado una mutación somática, pero para que la progenie de esta célula se transforme en cancerosa, ha de sufrir más cambios, los cuales probablemente requieren varias mutaciones adicionales. Este fenómeno de progresión tumoral, que generalmente dura muchos años, refleja la operación de evolución por mutación y selección natural entre las células somáticas; la velocidad de este proceso es acelerada por agentes mutagénicos (iniciadores tumorales) así como por ciertos agentes no mutagénicos (promotores tumorales) que afectan a la expresión génica, estimulan la proliferación celular y alteran el balance ecológico de células mutantes y no mutantes. Así, en el desarrollo de un cáncer dado contribuyen muchos factores; algunos de estos factores son características del entorno que se podrían evitar, por lo que, en principio, una gran proporción de cánceres se pueden prevenir.

1.6. APOPTOSIS:

La apoptosis es la muerte celular programada o suicidio celular. Cuando esto ocurre la célula se encoge y desprende de sus vecinas. En la superficie aparecen burbujas (la célula parece hervir) y 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.

1.7. LÍPIDOS.

Las moléculas de lípidos juegan un papel central en la transducción de señales y la regulación del crecimiento y la viabilidad de la célula. De hecho, esto se hace evidente ahora que la relevancia biológica de las moléculas de lípido trasciende sus funciones estructurales como componentes de organelos celulares. Se ha mostrado que los lípidos también ejercen un papel activo en la red compleja de reacciones que regulan la fisiología celular. El concepto de los lípidos como factores de señalización y reguladores se aplicó primero a los glicerofosfolípidos y los productos de su metabolismo. Así, moléculas como el diacilglicerol (DAG), el inositol trifosfato (IP₃), el ácido fosfatídico (PA) y el factor activador de plaquetas (PAF) se asocian con la regulación de eventos básicos que controlan la homeostasis intracelular y la comunicación intercelular, incluyendo la proliferación celular y la inflamación (Liscovith y Cantley, 1994; Spiegel y col., 1996). Dadas estas funciones cruciales para las moléculas de lípidos, la regulación de las enzimas que controlan su metabolismo y, por consiguiente, modulan sus niveles intracelulares asume un papel crítico. La alteración del control de estas enzimas puede producir problemas serios en el mantenimiento de la homeostasis y el balance entre las señales lipídicas intracelulares, lo cual regula, inhibiendo o activando, funciones celulares tales como la proliferación celular y el arresto del crecimiento o la apoptosis.

Un gran número de estudios designó como relevantes para la regulación del crecimiento y la viabilidad celulares y la transformación a las moléculas lipídicas de señalización, DAG y, más recientemente, la ceramida. Se ha observado que los niveles del DAG aumentan en respuesta a estímulos mitogénicos como los factores de crecimiento, la proteína ras y otros agentes oncogénicos o transformantes (Lacal y col., 1987; Grand y Owen, 1991). La degradación del

fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), es la vía es más estudiada para la generación de DAG, con un aumento concomitante en el Ca²⁺ intracelular, secundario a la generación de inositol trifosfato; ambos activan sinérgicamente la actividad de la proteína cinasa C (PKC) (Majerus y col., 1986; Nishizuka, 1992). Otros mecanismos principales de producción de DAG son mediados por la acción consecutiva de la fosfolipasa D (PLD) específica para PC y la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico (PAP); y por la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) a través de una PLC específica para PC (PC-PLC) (Divecha e Irvine, 1995).

1.7.1. Participación de moléculas lipídicas en la señalización celular.

Funcionalmente, una característica distintiva de los esfingolípidos es esta aparente participación en caminos distintos de regulación celular pro o anti-proliferativa. Por ejemplo, la ceramida (Cer) (Kolesnick y Golde, 1997; Obeid y col., 1993) y la esfingosina (Sph) (Ohta y col., 1995; Sweeney y col., 1996) son importantes participantes reguladores en muerte celular programada (apoptosis); mientras que la esfingosina 1-fosfato (Sph-1-P) induce mitogénesis y se ha implicado como segundo mensajero en la proliferación celular inducida por el factor de crecimiento derivado de plaquetas y por el suero (Olivera y Spiegel, 1993). El balance entre los niveles intracelulares de Cer y Sph-1-P y sus efectos reguladores sobre los miembros de las diferentes familias de proteínas cinasas activadas por mitógeno puede determinar el destino de la célula (Cuvillier y Col, 1996).

Ahora se reconoce que las distintas vías del metabolismo de los esfingolípidos pueden determinar si una célula sobrevive o se muere. Se ha demostrado que la ceramida es un importante componente regulador de la apoptosis (Kolesnick y Golde, 1997; Obeid y col., 1993), Sph-1-P está involucrada en la supervivencia celular como una molécula de señalización (Spiegel y Merrill, 1996). En contraste, en diversos estudios se menciona que Sph media

respuestas mitogénica o apoptótica, dependiendo del tipo celular (Zhang, 1990; Jacobs y Kester, 1993).

La esfingosina se sintetiza por condensación del palmitol CoA con el aminoácido serina, seguida de descarboxilación y desaturación. Cuando la esfingosina se acila con un acil CoA se forma ceramida, que al reaccionar con la CDP-colina produce esfingomielina.

A partir de las ceramidas por glucosidación con UDP-azúcares y ácido CMP-N-acetil-neuramínico, se forman los cerebrósidos y los gangliósidos.

En el aparato de Golgi se llevan a cabo algunas reacciones, donde la esfingomielina y el complejo de esfingolípidos (glucolípidos, gangliósidos) se sintetizan.

La esfingomielina sintasa forma la esfingomielina y la enzima inicial predominante en síntesis del glucolípidos es la glucosilceramida sintasa (GCS), esta sirve entonces como precursor para muchos glucolípidos y gangliósidos (Werner, 1988).

1.8. ESFINGOLÍPIDOS.

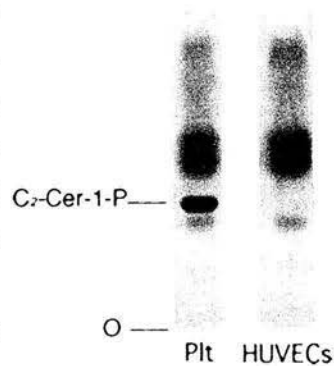
Son moléculas anfipáticas, pues tienen dos residuos hidrofóbicos en la "cola" y un residuo hidrófilo en la "cabeza". Esta clase de lípidos también se presenta en las membranas, pero están más restringidos que los fosfolípidos en la distribución celular.

Los Esfingolípidos carecen de glicerol y tienen un residuo de esfingosina y una de ácido graso los cuales marcan la región hidrofóbica de la molécula y la cabeza polar consta de algunas clases de residuo hidrófilo unido a la esfingosina (Sph). La esfingomielina es el más abundante de los Esfingolípidos conocidos (Mazur y Harrow, 1993).

Para aclarar la participación de los esfingolípidos en la hemostasis, trombosis, y la biología vascular, se ha estudiado el metabolismo y los efectos funcionales de derivados de Sph en plaquetas humanas.

La Sph exógena se incorpora activamente en las plaquetas y rápidamente se convierte a Sph-1-P, la cual después se localiza extracelularmente; esto es importante para estudiar los efectos de Sph y Sph-1-P en células endoteliales desde el punto de vista de interacción de plaqueta célula-endotelial (fig.1)

Figura 1.-Detección de Sph-1-P en los extractos de plaquetas humanas y HUEVEC's.



La esfingosina (Sph) exógena se incorpora activamente en las plaquetas y rápidamente es convertida a esfingosina 1-fosfato (Sph-1-P), la cual además se libera extracelularmente; esto es importante para estudiar los efectos de Sph y Sph-1-P en las células endoteliales desde el punto de vista de la interacción célula endotelial-plaqueta. En un estudio, se encontró que Sph, así como la ceramida, inducen apoptosis en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs). En contraste, la Sph-1-P actúa como un factor de supervivencia en las HUVEC. Los resultados sugieren que las plaquetas pueden mantener la integridad de las células endoteliales porque las plaquetas incorporan Sph y liberan Sph-1-P que captan las células endoteliales. Se ha demostrado que Sph-1-P protege a las células HUVECs de la apoptosis inducida por el retiro de factores de crecimiento. Además, Sph-1-P estimula la síntesis de DNA en las HUVECs e indicando que este lípido bioactivo actúa como un factor de supervivencia en las HUVEC por protección de la apoptosis y por estimulación de la proliferación (figura 2).

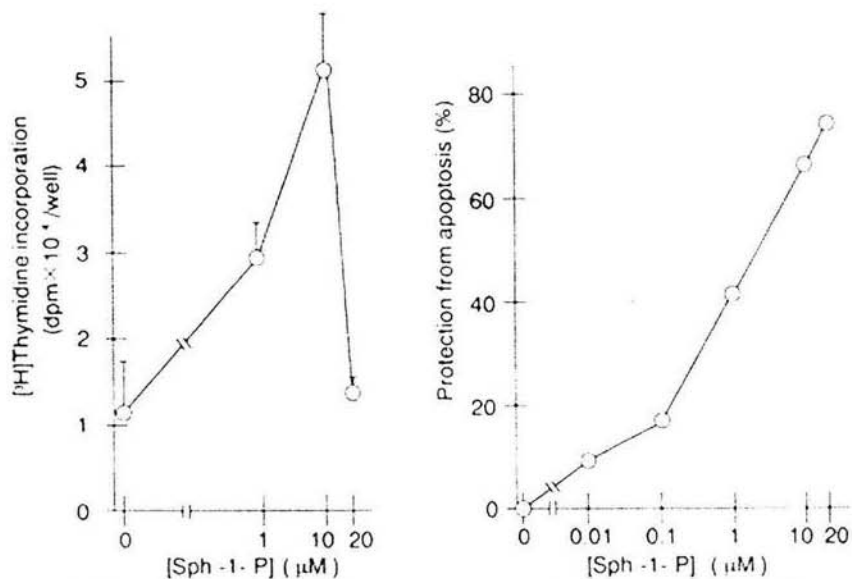
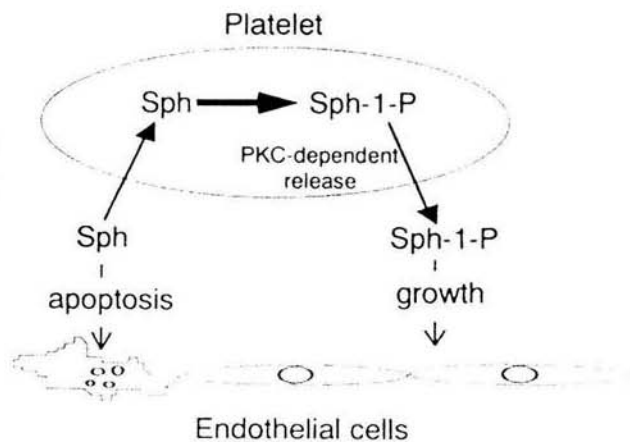


Figura 2.- Estimulación de síntesis de DNA y supresión de apoptosis por Sph-1-P

En resumen, la Sph actúa como un inductor de la apoptosis de la célula endotelial, mientras que Sph-1-P actúa como un factor de supervivencia. Las Plaquetas puede mantener la integridad de las células endoteliales incorporando Sph y liberando Sph-1-P (Figura 3).

figura 3.- Interacción célula endotelial-plaqueta desde el punto de vista de esfingolípidos.



1.9. LA CERAMIDA INDUCE APOPTOSIS.

Por otro lado, 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 (el factor- α tumor necrosico (TNF- α), interleucina-1, el interferón γ , la vitamina D3, el ayuno de suero) y en varias diferentes líneas celulares (Kolesnick y Golde, 1994). La regulación intracelular de los niveles de ceramida es controlada por un sistema complejo de reacciones metabólicas, que incluyen la acción de diferentes esfingomielinasas (SMasas), ceramidasa, cinasa de ceramida, glucosiltransferasa, sintasa de ceramida, y posiblemente desaturasa de dihidroceramida (Hannun y Linardic, 1993; Hannun, 1994).

La apoptosis puede ser inducido por citosina, radiación ionizante, y los agentes anticáncer (Smyth y col., 1997; Haimovitz-Friedman y col., 1997). Se ha mostrado que la ceramida media la apoptosis y actúa como un segundo mensajero celular en innumerables vías de transducción de señales en forma de cascada (Testi, 1996). Agentes extracelulares, como el calcitriol, TNF - α , interferón- γ , e interleucina-1 promueven la producción de ceramida por hidrólisis de esfingomielina (Smyth y col., 1997). La ceramida potencialmente actúa como un lípido fijador y puede estar implicada como un mediador importante para detener el ciclo celular y la apoptosis que, dependiendo del contexto celular, puede ser indirecto o directo.

Hay evidencias de que dos enzimas importantes que regulan las concentraciones de la ceramida intracelular, la glucosilceramida (GlcCer) y esfingomielina (SM) sintasa, están bajo el control de las caspasas.

Los análogos de ceramida permeables para la célula pueden inducir directamente apoptosis en las líneas celulares U937, P388, HL-60, MCF-7, y BL 30A del linfoma de Burkitt (Bose y Kolesnick, 1995; Ziad y col, 1994; Cabot y Giuliano, 1997). También la radiación ionizante saca provecho de la ceramida y comienza la apoptosis; sin embargo, la pérdida de producción de ceramida

ha mostrado conferir resistencia para apoptosis inducida por radiación. La glucosilación de la ceramida catalizada por glucosilceramida sintasa (GCS) es un mecanismo eficaz para disminuir el amenazado incremento en ceramida causado por agentes exógenos. La actividad de GCS contribuye a disminuir el alto efecto potencial citotóxico de la ceramida, como se ha mostrado en los experimentos en los que las células MCF-7/GCS fueron expuestas a adriamicina o C₆-ceramida (Liu y col., 1999).

La inyección Intra-peritoneal o intradérmica de GC emulsionado en los ratones inducen hipertrofia del hígado y proliferación epidérmica (Datta y Radin, 1988; Marsh y col., 1995). Estos datos sugieren que el aumento de GC estimula la proliferación del hepatocito y la mitogénesis epidérmica a través de un mecanismo relativamente directo. El agotamiento de GC endógena causa un detenimiento del ciclo celular (Rani y col., 1995). Sólo se observó un aumento ligero en GC en las células MCF-7/GCS comparadas con las células MCF-7 (Liu y col., 1999). Esto sugiere que GC no contribuye a la resistencia a los fármacos; sin embargo, no se conoce el papel exacto de GC en la resistencia a la adriamicina exhibida en las células MCF-7/GCS. Con la evidencia directa presentada por (Liu y col., 1999), se postula que la actividad de GCS es una de las causas de la resistencia celular a la adriamicina y la resistencia a la ceramida. La glucosilación de la ceramida, en respuesta a la generación de novo de ceramida promovida por el tratamiento con adriamicina, atenúa la respuesta citotóxica.

1.10. ACTIVIDAD DE LA SINTASA DE ESFINGOMIELINA.

Una de las enzimas más relevantes que regulan los niveles de ceramida es la fosfatidilcolina: ceramida fosfocolina transferasa (esfingomielina sintasa; SMS) que transfiere el grupo fosfocolina de fosfatidilcolina a la ceramida para generar la esfingomielina (SM) y DAG (Ullman y Radin, 1974; Hatch y Vance, 1992). Esta enzima tiene la capacidad importante de regular directamente, en

direcciones opuestas, los niveles de ceramida y DAG dentro de las células y controla potencialmente procesos celulares opuestos como la proliferación celular, el arresto del crecimiento y la apoptosis (Hampton y col., 1989). A pesar del gran potencial biológico de la SMS, muy poco se conoce sobre la enzima. El mayor esfuerzo se ha centrado en estudiar su localización intracelular (Voulker y Kennedy, 1982), pero su localización exacta y su distribución todavía espera ser elucidada. Es más, pocos informes están disponibles en la literatura sobre la regulación de esta enzima.

PC-PLC y SMS comparten varias características bioquímicas, topológicas y biológicas, por lo que existe la posibilidad que la actividad de SMS podría considerarse para muchas de las funciones que se han propuesto ser específicas para la fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), dado las propiedades similares de las dos enzimas. Ambas enzimas parecen funcionar en pH neutro, y las dos parecen localizarse en la membrana plasmática. Por otro lado, SMS también puede convertir PC en DAG (Figura 4).

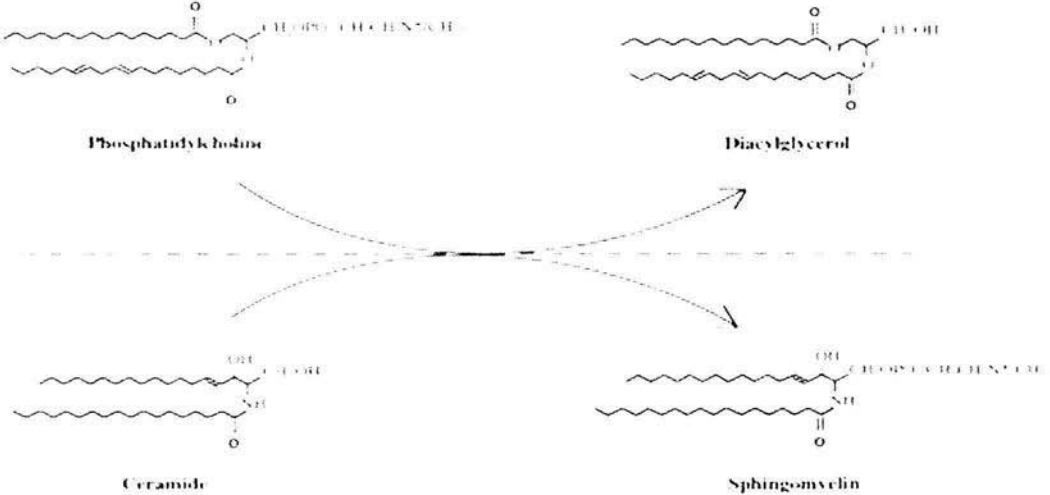


Figura 4.- Esquema de la reacción enzimática regulado por esfingomielina sintasa

El tratamiento con esfingomielinasa bacteriana (bSMasa) de fibroblastos pulmonares lleva a considerar la interesante posibilidad de que la diferencia principal en actividad de SMS entre dos líneas celulares es quizás debida a una forma de la enzima que reside en la membrana plasmática o en proximidad funcional a él.

Cuando la actividad de SMS se ensayó *in vitro* usando una fracción de membrana celular entera como fuente de la enzima, porque este procedimiento incluye la actividad de la SMS total. Basado en éstos y otros resultados, uno puede suponer la presencia de por lo menos dos SMSs, uno más directamente involucrado en la de la síntesis *de novo* y el segundo SMS más conectado preferentemente a ceramida de la membrana plasmática. De hecho los datos disponibles en la literatura de los estudios de fraccionamiento subcelular parecen localizar la mayoría de la actividad de SMS en el *cis*/ Golgi medial (Futerman y pagano, 1990; Jeckel y Wieland, 1990; Lipsky y pagano, 1983; Schweizer y col., 1994). Con un componente de la actividad en la membrana plasmática (Marggraf y col., 1981; Marggraf y Kanfer, 1987), retículo endoplásmico (Bernert y Ullman, 1981; Van golde y Fleisher, 1974), y mitocondria (Sribney, 1971), considerando que parece ausente en los endosomas. Adicionalmente, se ha propuesto que la actividad de la SMS que se presenta en diferentes compartimientos celulares puede estar involucrados en diferentes procesos biológicos. Ya se ha sugerido que la SMS localizada en el Golgi podría ser más específicamente responsable para la síntesis *de novo* de SM; considerando la forma localizada en la membrana plasmática podría jugar un papel más específico en eventos de transducción de señales (Hostetler y Morris, 1976).

Un papel importante para la SMS en la regulación del crecimiento de la célula funciona a través de la modulación de los niveles de ceramida y DAG. A través de esta reacción (Figura 4), la enzima tiene la habilidad de regular, en direcciones opuestas, los niveles intracelulares de ceramida y DAG. Ambas

moléculas han mostrado ser importantes bioefectores o segundos mensajeros lipídicos. La ceramida ha mostrado mediar y imitar la habilidad de algunos efectores (semejantes al factor- α tumor necrótico (TNF- α), vitamina D₃, interleucina-1) para inducir apoptosis, parar el crecimiento metabólico y otras funciones de señalización (Okasaki y col., 1989), que se originan de diferentes receptores de la superficie de célula, incluso el interferón- γ , TNF- α , interferón-1 β , CD95 (Fas/APO-1), factor de crecimiento neuronal receptor para el CD28 (Testi, 1996; Haimovitz-Friedman, 1997). La ceramida también interviene en la acción de la proteína cinasa C ξ , protooncogene *vav*, 1 α -25-dihidroxi vitamina D₃, dexametasona, radiación ionizante, y agentes quimioterapéuticos (Testi, 1996; Haimovitz-Friedman, 1997). Hay varias líneas de evidencia que sugieren que la pérdida de producción de ceramida es una causa de resistencia celular a la apoptosis inducida por cualquier radiación ionizante, TNF- α , o adriamicina. Se ha sugerido que TNF α activa la fosfolipasa C específica para la fosfatidilcolina (PC-PLC), y el diacilglicerol resultante (DAG) funciona como un activador de proteína cinasa C (Schütze y col., 1992). La Proteína cinasa C puede contribuir en la activación de NF- κ B por agentes antineoplásicos (Das y White, 1997). TNF α también se conoce por inducir la hidrólisis de esfingomielina y la generación concomitante de ceramida (Hannun, 1996), y han habido muchos esfuerzos por conocer si ceramida esta vinculada con la activación del factor de transcripción factor nuclear κ B (NF- κ B). Algunos estudios sugieren que la ceramida juega un papel esencial en la activación de NF- κ B (Yang, 1993), y en un esquema propuesto, sugiere que el DAG generado por la PC-PLC causa la activación de la esfingomielinasa ácida, y la resultante ceramida induce la activación del NF- κ B (Schütze y col., 1992) (figura 5).

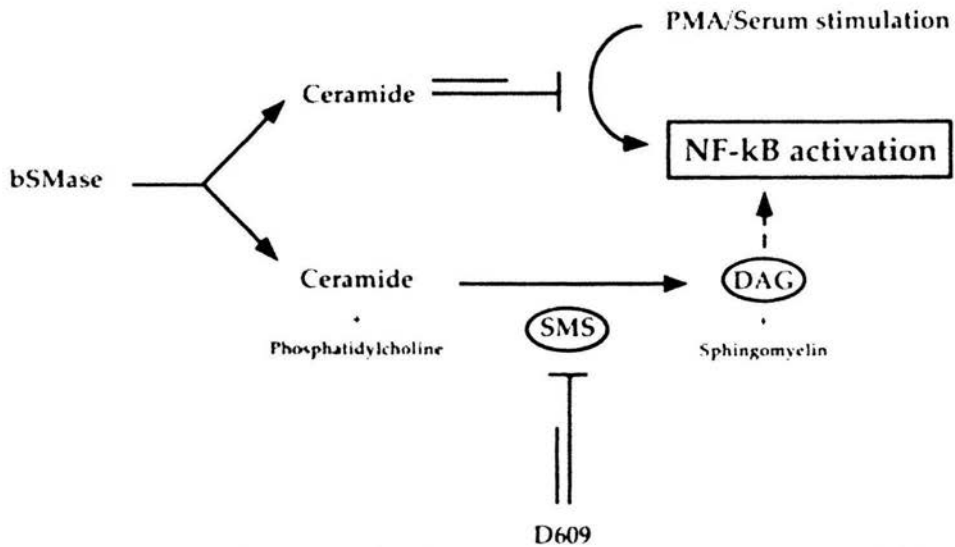


Figura 5.- representación esquemática del papel potencial de ceramida en la activación de NF-κB

La acción de ceramidas exógenas o bSMasa en la ausencia de actividad de SMS produce inhibición de la activación de NF-κB. Estos resultados sugieren que el metabolismo de la ceramida es necesario para la activación de NF-κB. Gamard y col. (Gamard y col., 1997) y Levade y Jaffrézou (Levade y Jaffrézou, 1999). Brevemente, Schütze y col. (Schütze y col., 1992) reportaron activación de NF-κB en células Jurkat T permeabilizadas y tratadas con SMase exógenas y concentraciones nanomolares de ceramida. Según este informe, la alta actividad de SMS puede eficazmente "convertir" una señal de ceramida a una de DAG, considerando que la actividad baja permite la predominancia de la señal de ceramida.

SMS puede tener un papel en la regulación fisiológica NF-κB. Esto es tentador para especular que un banco específico de DAG (o metabolitos subsecuentes) formados de PC por la acción de SMS puede acoplar a muchos agentes para la activación de NF-κB.

DAG, por otro lado, ha mostrado jugar un papel antiapoptótico y estimulador para la proliferación de la célula además de otras funciones de señalización (Exton, 1994). Así, parece que estos dos lípidos diferentes ejercen, sin oposición, papeles controlando los procesos que llevan a las células a sufrir muerte de la célula o parar el crecimiento o para progresar el ciclo de la célula (Laurenz y Chapkin, 1996).

La regulación de la proporción entre la ceramida intracelular y niveles de DAG puede ser un estado natural importante en la regulación de la muerte de la célula su viabilidad y posiblemente otras funciones. Si éste es el caso, SMS puede ser un componente en la regulación directa de este equilibrio.

Se puede suponer que la SMS en retículo endoplásmico/Golgi es el determinante primario de los niveles del estado basal de SM a través de la regulación de la síntesis *de novo* considerando que la SMS dirigida a la ceramida generada en la membrana plasmática, puede ser un regulador primario de la proporción de DAG/ceramida.

Varios autores han informado que el porcentaje molar de SM y la proporción de SM/PC aumentan en hematomas de Morris (Hostetler y Morris, 1976). En medios *in vitro* se muestra un aumento dramático (aproximadamente 7-veces) de actividad de SMS en homogenizados preparados de hematomas de Morris 3924A comparados con preparados de hígados normales. Estos resultados apoyan un informe previo de la actividad de la esfingomielina sintasa (SMS) en hematomas (Van Den Hill y col., 1985). En ese estudio, utilizando procedimientos de subfraccionamiento, la actividad de SMS se encontró predominantemente en la membrana plasmática y era elevado (1.5-3.0-veces) comparada con el hígado control o normal. Los resultados encontrados apoyan un papel para la SMS en la transformación de la célula y regulación a través de su habilidad para modular los niveles de ceramida y DAG (figura 6).

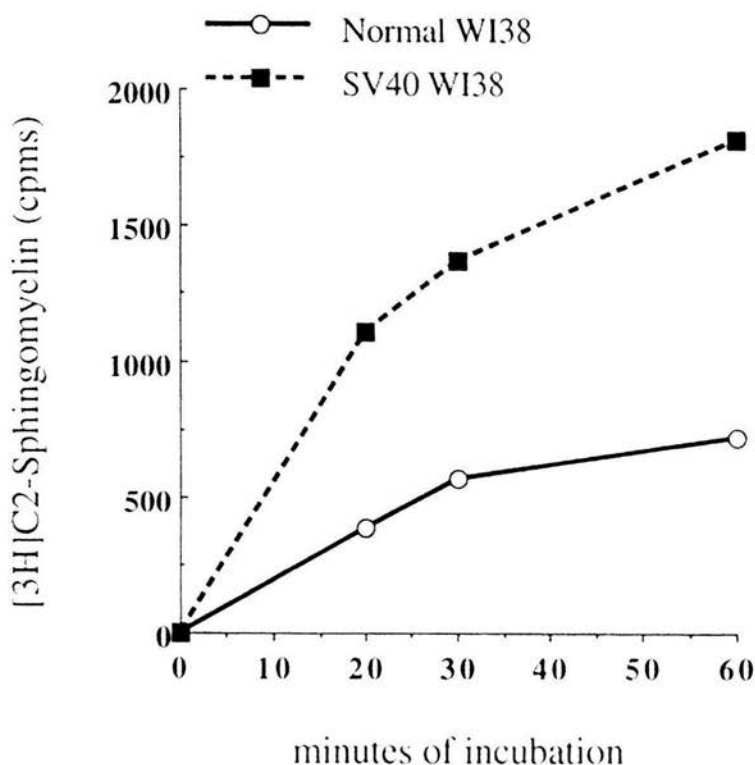


Figura 6.- Medición *In vitro* de la actividad basal de la sintasa de esfingomielina en células WI38 normales y transformadas con SV-40.

1.11. ACTIVIDAD DE LA SINTASA DE LA GLUCOSILCERAMIDA.

Participación de los glucolípidos en procesos celulares relevantes.

Los glucolípidos, además de ser esenciales estructurales elementos de la membrana, participan en procesos como la proliferación celular (Hannun y Bell, 1989), la diferenciación (Watanabe y col., 1998), y la transformación oncogénica (Hakamori, 1981). Observaciones recientes muestran que las células de cáncer resistentes a muchos fármacos característicamente muestran niveles elevados de un glucolípido identificado como glucosilceramida (GC); recientemente se ha mostrado que la glucosilceramida puede estar asociada

con la resistencia a la quimioterapia (Lavie y col., 1996; Lavie y col., 1997; Cabot y Giuliano, 1997).

Un trabajo reciente de Lavie y col. (1996) reveló una correlación entre el nivel celular de los glucoesfingolípidos y la multiresistencia a fármacos (MDR). Esto indica un papel potencial para los glucoesfingolípidos en la MDR. Otros trabajos revelaron una relación entre la actividad de la esfingomielinasa y la MDR (Jaffrezou y col., 1991). Las células MDR se caracterizan por la alta resistencia a la toxicidad de los fármacos. Los quimiosensibilizadores son agentes que aumentan la sensibilidad de las células MDR a la influencia tóxica de fármacos previamente menos eficaces, que están ayudando a conocer el modo de acción de estos fármacos. Un desafío en la quimioterapia del cáncer es entender los mecanismos moleculares por los que los quimiosensibilizadores evitan la resistencia a los fármacos antineoplásicos. El Tamoxifen se muestra potencialmente útil para inhibir la producción de la glucosilceramida y concomitantemente para suprimir la síntesis de algún gangliósido más complejo en células MCF-7-AdrR (Figura 7).

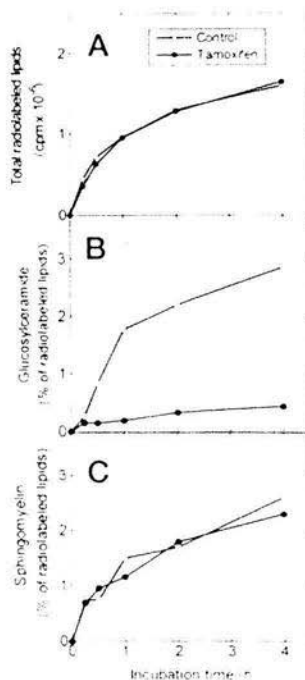


Figura 7.- Patrón temporal para la influencia del tamoxifen sobre los lípidos totales, la glucosilceramida y la formación de esfingomielina en células MCF-7AdrR.

Como ya hemos dicho, los esfingolípidos y los glucoesfingolípidos tienen funciones en la proliferación celular (Hakamori, 1993), el crecimiento neuronal (Schwartz, 1995; Furuya y Hirabayashi, 1995), la transformación celular (Hakamori, 1993) y la progresión del tumor (Turín y Koprowski, 1986). La glucosilceramida es el precursor de los glucoesfingolípidos. Mientras la

ceramida es un segundo mensajero para la muerte programada de la célula (Obeid y Hannun, 1993), los glucoesfingolípidos demuestran tener un papel en el crecimiento celular y la supervivencia (Furuya y Hirabayashi, 1995) y en el escape del proceso de apoptosis (Nakamura, 1996). La inhibición de la síntesis de glucoesfingolípidos se relaciona con una serie de disfunciones celulares (Furuya y Hirabayashi, 1995). Como la glucosilceramida sintasa y la SM sintasa se activan en células sensibles a las caspasas, se piensa en un nuevo enlace funcional entre las caspasas y la ceramida durante los procesos apoptóticos.

Las proteasas de la familia de las caspasas se consideran como importantes transductores de señales fisiológicas y ejecutores de apoptosis inducidos por una variedad de estímulos exógenos (Nagata, 1997).

La enzima que cataliza la síntesis de la glucosilceramida, la glucosilceramida sintasa, tiene un papel central en el metabolismo del glucoesfingolípidos. Estudios sobre la inhibición de la glucosilceramida sintasa por 1-fenil-2-palmitoilamino-3-morfolino-1-propanol (PPMP), un inhibidor sintético que actúa como un análogo de ceramida, revelaron una diversidad de procesos fisiológicos afectados por el agotamiento de la glucosilceramida y glucoesfingolípidos en las células más complejas (Schwartz, 1995)

La acumulación de GC es una característica de algunas células de cáncer MDR y tumores obtenidos de pacientes con menor respuesta a la quimioterapia (Lavie y col., 1996). Algunos estudios muestran que los moduladores de MDR de varias estructuras químicas inhiben la producción de GC (Lavie y col., 1997). Aunque estos estudios documentan la acumulación de GC en células cancerosas multiresistentes a fármacos, poco se conoce sobre la expresión de GCS en células MDR y su relación con la resistencia a fármacos. En particular, no se conoce si el aumento de los niveles de GC se debe a la expresión del gen GCS o a otros factores de resistencia a fármacos que juegan un papel modulando la activación o degradación de GCS.

En una investigación de Liu y col. (1999) se introdujo DNA complementario de GCS (cDNA) en células MCF-7 y se caracterizaron los resultados de la línea de la célula MCF-7/GCS. Las células MCF-7/GCS expresaron favorablemente el mRNA de GCS (Figura 8B) y se demostró un incremento en la actividad enzimática de GCS (Figura 8A). Las células MCF7/GCS que expresan GCS se resisten al efecto tóxico de adriamicina y de ceramida. Estos dos tóxicos celulares solo tienen efecto si se aumentan 11 veces en concentración de adriamicina y 5 veces la de ceramida.

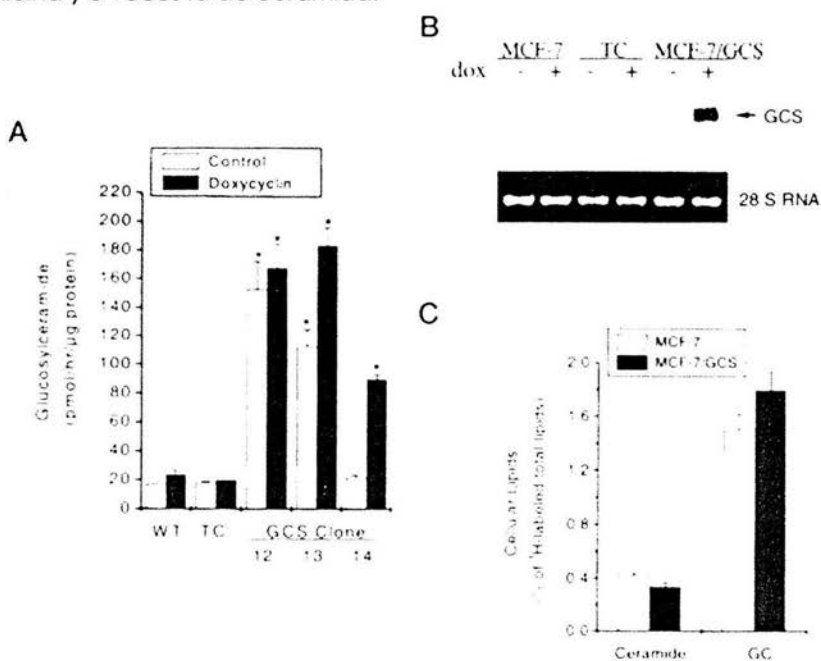


Figura 8A.- Actividad de glucosilceramida sintasa y expresión mRNA de GCS en células MCF-7/GCS

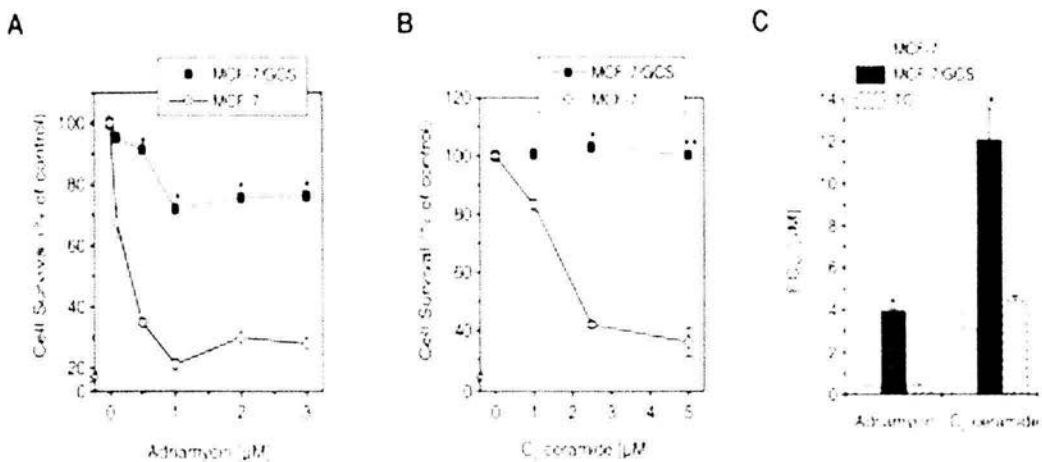


Figura 8B.- toxicidad de adriamicina y ceramida en células MCF-7 y MCF-7/GCS transfectadas con GCS

La expresión estable de GCS induce resistencia a la adriamicina en células MCF-7/GCS. La resistencia a la Ceramida, además es una propiedad de las células transferidas, con mucha correlación con la expresión inducida de la GCS. Las células MCF-7/GCS representan un nuevo modelo para estudiar el papel de GCS en la diferenciación de la célula, muerte programada de la célula, y la resistencia a agentes antineoplásicos que causan producción de ceramida (Bose y Kolesnick, 1995; Ziad y col., 1994).

Antes de este trabajo de laboratorio se demostró que la MDR se asocia con una acumulación de GC y la reversión de la resistencia al fármaco por moduladores de MDR es acompañado por una disminución en la composición celular de GC (Cabot y Giuliano, 1997). Basado en estos datos, se cree que la vía de GC es un mecanismo alternativo de resistencia a fármaco y que la expresión incrementada de glucosilceramida de sintasa (GCS) sería importante en este evento biológico. Las células MCF-7 son sensibles a las drogas

anticáncer y a la radiación ionizante, TNF α , y CD95 (Cai y col., 1997). Después de la introducción y expresión de GCS las células MCF-7/GCS son resistentes a la adriamicina y a la ceramida. Es más, la resistencia a la ceramida se correlacionó estrechamente con la expresión inducida del mRNA de GCS y la actividad de la enzima GCS. Varios estudios mostraron que los efectos de dosis terapéuticas de adriamicina y daunorubicina se relacionan con la elevación de la ceramida celular (Bose y Kolesnick, 1995; Ziad y col., 1994). En este estudio confirmaron que el tratamiento con adriamicina da un aumento en la ceramida celular y que induce la actividad de catálisis en GCS y la eliminación de ceramida a través de su glucosilación (Figura 9).

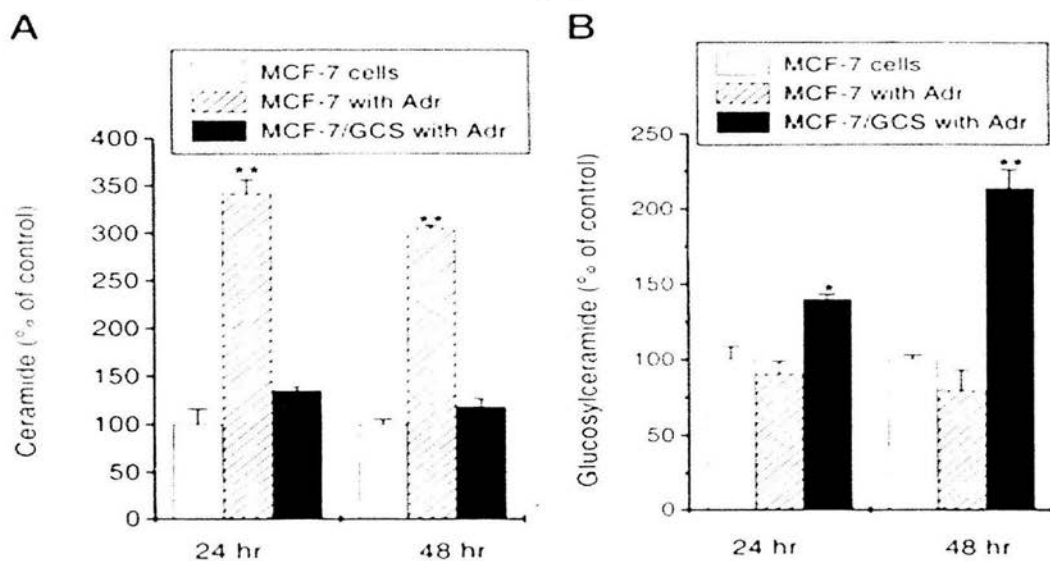


Figura 9.- Metabolismo de ceramida en células MCF-7 y en MCF-7/GCS en respuesta al tratamiento con adriamicina. (A) adriamicina aumenta el nivel de la ceramida en las células MCF-7 pero no en las células MCF-7/GCS, que como se nota en (B) se debe al consumo de la ceramida por su conversión a glucosilceramida.

II .CONCLUSIÓN.

La glucosilceramida se asocia con la resistencia a la quimioterapia en las células tumorales. Además, el mantenimiento de los niveles de glucosilceramida en células de multirresistencia a fármacos (MDR) es importante para prevenir la apoptosis.

Durante el proceso de transformación existe elevada actividad de la enzima esfingomielina sintasa la cual se asocia con la activación del factor de transcripción NF- κ B.

Las células de hepatoma y de fibroblastos transformados tienen un alto nivel de la sintasa de esfingomielina, una actividad casi ausente en los fibroblastos normales y muy baja en células hepáticas normales.

III. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B. (1996). "Biología Molecular de la Célula". Edit. Ediciones Omega, S.A. Primera edición Barcelona, España. Pag.-776-951.

Albert Lehninger, L. (1995) "**Bioquímica**". Edit. Omega S.A. decimoctava edic. Barcelona, España. Pag. 860

Arthur C.G. (1979) "**Fisiología y Fisiopatología Básicas**". Edit. Interamericana Segunda edic. México, D.F. Pag. 28-29

Arthur, W.H. y David, H.C. (1985) "**Tratado de histología**". Edit. Interamericana. Séptima edic. México, D.F. Pag. 90-91

Bernert, J. T., and Ullman, M. D. (1981) **Biosynthesis of sphingomyelin from erythro-ceramides and phosphatidylcholine by a microsomal cholinephosphotransferase.** *Biochim. Biophys. Acta* **666**, 99-109

Bohinski, R.C. (1991) "**Bioquímica**". Edit. Addison-Wesley Iberoamericana. Quinta edic. Barcelona, España. Pag.100-101

Bose, R., Verheil, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (1995) **Ceramide Synthase Mediates Daunorubicin-induced Apoptosis: an Alternative Mechanism For Generating Death Signals**. *Cell* **82**, 405-414

Cabot, M. C., and Giuliano, A. E. (1997) **Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells**. *Breast Cancer Res. Treat.* **46**, 293 (abstr.)

Cai, Z., Bettaieb, A., El Mahdani, N., Legres, L. G., Stancou, R., Masliah, J., and Chouaib, S. (1997) **Alteration of the Sphingomyelin/Ceramide Pathway Is Associated with Resistance of Human Breast Carcinoma MCF7 Cells to Tumor Necrosis Factor- α -mediated Cytotoxicity**. *J. Biol. Chem.* **272**, 6918-6926

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S. (1996) **Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate**. *Nature*. **381**, 800

Das, K. C., and White, C. W. (1997) **Activation of NF- κ B by Antineoplastic Agents. ROLE OF PROTEIN KINASE C**. *J. Biol. Chem.* **272**, 14914-14920

Datta, S. C., and Radin, N. S. (1988) **Stimulation of liver growth and DNA synthesis by glucosylceramide**. *Lipids* **23**, 508-510

Divecha, N., and Irvine, R. F. (1995) **Phospholipid Signaling**. *Cell* **80**, 269-278

Exton, J. H. (1994) **Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction**, *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 26-42

Furuya, S., Ono, K., and Hirabayashi, Y. (1995) **Sphingolipid biosynthesis is necessary for dendrite growth and survival of cerebellar Purkinje cells in culture**. *J. Neurochem.* **65**, 1551-1561

Futerman, A. H., Stieger, B., Hubbard, A. L., and Pagano, R. E. (1990) **Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus**. *J. Biol. Chem.* **265**, 8650-8657

Gamard, C. J., Dbaibo, G. S., Liu, B., Obeid, L. M., and Hannun, Y. (1997) **Selective Involvement of Ceramide in Cytokine-induced Apoptosis. CERAMIDE INHIBITS PHORBOL ESTER ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR κ B**. *J. Biol. Chem.* **272**, 16474-16481

Grand, R. J. A., and Owen, D. (1991) **The biochemistry of ras p21**. *Biochem. J.* **279**, 609-631

Haimovitz-Friedman, A., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (1997) **Ceramide signaling in apoptosis**. *Br. Med. Bull.* **53**, 539-553

Hakomori, S. (1981) **Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis**. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 733-764

Hakamori, S. (1993) **Structure and function of sphingoglycolipids in transmembrane signalling and cell-cell interactions.** *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 583-595

Hampton, R. Y., Morand, O. H., and Hannun, Y. A. (1989) **Sphingomyelin synthase and PKC activation.** *Science* **246**, 1050

Hannun, Y. A. (1994) **The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide.** *J. Biol. Chem.* **269**, 3125-3128

Hannun, Y. A. (1996) **Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress.** *Science* **274**, 1855-1859

Hannun, Y. A., and Bell, R. M. (1989) **Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation.** *Science* **243**, 500-507

Hannun, Y. A., and Lincardic, C. M. (1993) **Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids.** *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 223-236

Hannun, Y.A., C. Luberto y K.M Argraves (2001). **Encimes of shinolipid metabolism: From modular to integrative signaling.** *Biochemistry* **40**, 4893-4903.

Hatch, G. M., and Vance, D. E. (1992) **Stimulation of sphingomyelin biosynthesis by brefeldin A and sphingomyelin breakdown by okadaic acid treatment of rat hepatocytes.** *J. Biol. Chem.* **267**, 12443-12451

Hostettler, K. Y., Zenner, B. D., and Morris, H. P. (1976) **Abnormal membrane phospholipid content in subcellular fractions from the Morris 7777 hepatoma.** *Biochim. Biophys. Acta* **441**, 231-238

Igarashi, Y. (1997) **Functional roles of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines: In regard to membrane sphingolipid signaling pathways.** *J. Biochem.* **122**, 1080

Jacobs, L.S., Kester, M. (1993) **Sphingolipids as mediators of effects of platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle.** *cells. Am J. Physiol.* **265**, C740

Jeckel, D., Karrenbauer, A., Birk, R., Schmidt, R. R., and Wieland, F. (1990) **Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi.** *FEBS Lett.* **261**, 155-157

Jaffrezou, J.-P., Herbert, J.-M., Levade, T., Gau, M.-N., Chatelain, P., and Laurent, G. (1991) **Reversal of multidrug resistance by calcium channel blocker SR33557 without photoaffinity labeling of P-glycoprotein.** *J. Biol. Chem.* **266**, 19858-19864

Kolesnick, R., and Golde, D. W. (1994) **The Sphingomyelin Pathway In Tumor Necrosis Factor and interleukin-1 Signaling.** *Cell* **77**, 325-328

Lacal, J. C., Moscat, J., and Aaronson, S. A. (1987) **Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-ras oncogene.** *Nature* **313**, 269-272

Laurenz, J. C., Gunn, J. M., Jolly, C. A., and Chapkin, R. S. (1996) **Alteration of glycerolipid and sphingolipid-derived second messenger kinetics in ras transformed 3T3 cells.** *Biochim. Biophys. Acta* **1299**, 146-154



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

IZT.

Lavie, Y., Cao, H., Volner, A., Lucci, A., Han, T. Y., Geffen, V., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. (1997) **Agents 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

Levade, T., and Jaffrézou, J.-P. (1999) Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?. *Biochim. Biophys. Acta* **1438**, 1-17

Lipsky, N. G., and Pagano, R. E. (1983) **Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 2608-2612

Liscovitch, M., and Cantley, L. C. (1994) **Lipid Second Messengers.** *Cell* **77**, 329-334

Majerus, P. W., Connolly, T. M., Deckmyn, H., Ross, T. S., Bross, T. E., Ishii, H., Bansal, V., and Wilson, D. (1986) **The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules.** *Science* **234**, 1519-1526

Marggraf, W. D., Anderer, F. A., and Kanfer, J. N. (1981) **The formation of sphingomyelin from phosphatidylcholine in plasma membrane preparations from mouse fibroblasts.** *Biochim. Biophys. Acta* **664**, 61-73

Marggraf, W. D., and Kanfer, J. N. (1987) **Kinetic and topographical studies of the phosphatidylcholine: ceramide choline phosphotransferase in plasma membrane particles from mouse ascites cells.** *Biochim. Biophys. Acta* **897**, 57-68

Marsh, N. L., Elias, P. M., and Holleran, W. M. (1995) **Glucosylceramides stimulate murine epidermal hyperproliferation.** *J. Clin. Invest.* **95**, 2903-2909

Mazur, A. y Harrow, B. (1993) **"Bioquímica básica"**. Edit. Interamericana
Décima edic. México, D.F. Pag.- 319-323

Nagata, S. (1997) **Apoptosis by death factor.** *Cell.* **88**, 355-365

Nakamura, S., Kozutsumi, Y., Sun, Y., Miyake, Y., Fujita, T., and Kawasaki, T. (1996) **Programmed cell death induced by ceramide.** *J. Biol. Chem.* **271**, 1255-1257

Nishizuka, Y. (1992) **Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.** *Science* **258**, 607-614

Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A., and Hannun, Y. A. (1993) **GD2 ganglioside biosynthesis is a distinct biochemical event in human melanoma tumor progression.** *Science* **259**, 1769-1771

Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A. (1993) **Programmed cell death induced by ceramide.** *Science.* **259**, 1769

Okazaki, T., Bell, R. M., and Hannun, Y. A. (1989) **Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation.** *J. Biol. Chem.* **264**, 19076-19080

Olivera, A., Spiegel, S. (1993) **Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens.** *Nature.* **365**, 557

Ohta, H., Sweeney, E.A., Masamune, A., Yatomi, Y., Hakomori, S., Igarashi, Y. (1995) **Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemic HL-60 cells: A possible endogenous modulator of apoptotic DNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation.** *Cancer Res.* **55**, 691

Pyne, S., D.G. Tolan, A.M. Conway y N. Pine (1996). **Lipids as regulators of cell function.** *Biochemical Society Transactions* **25**, 549-556.

Rani, C. S. S., Abe, A., Chang, Y., Rosenzweig, N., Saltiel, A. R., Radin, N. S., and Shayman, J. A. (1995) **Cell Cycle Arrest Induced by an Inhibitor of Glucosylceramide Synthase.** *J. Biol. Chem.* **270**, 2859-2867

Robertis, E.D.P. (1981) "**Biología celular y molecular**". Edit. El ateneo
Décima edic. Buenos Aires, Argentina. Pag.162-164

Schütze, S., Potthof, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., and Krönke, M. (1992) **TNF Activates NF- κ by Phosphatidylcholine-specific Phospholipase C-induced "acidic" Sphingomyelin Breakdown.** *Cell* **71**, 765-776

Schwarz, A., Rapaport, E., Hirschberg, K., and Futerman, A. H. (1995) **A Regulatory Role for Sphingolipids in Neuronal Growth.** *J. Biol. Chem.* **270**, 10990-10998

Schweizer, A., Clausen, H., van Meer, G., and Hauri, H. P. (1994) **Localization of O-glycan initiation, sphingomyelin synthesis, and glucosylceramide synthesis in Vero cells with respect to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment.** *J. Biol. Chem.* **269**, 4035-4041

Smyth, M. J., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (1997) **Ceramide: a novel lipid mediator of apoptosis.** *Adv. Pharmacol.* **41**, 133-154

Spiegel, S., Foster, D., and Kolesnick, R. (1996) **Signal transduction through lipid second messengers.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 159-167

Spiegel, S., Merrill, A.H. Jr. (1996) **Sphingolipid metabolism and cell growth regulation.** *FASEB J.* **10**, 1388

Sribney, M. (1971) **Stimulation of sphingomyelin synthetase by sulfhydryl reagents** *Can. J. Biochem.* **49**, 306-310

Sweeney, E.A., Sakakura, C., Shirahama, T., Masamune, A., Ohta, H., Hakomori, S., Igarashi, Y. (1996) **Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines.** *Int J Cancer.* **66**, 358

Testi, R. (1996) **Sphingomyelin breakdown and cell fate.** *Trends Biochem. Sci.* **21**, 468-471

Thurin, J., Thurin, M., Herlyn, M., Elder, D. E., Steplewski, Z., Clark, W. H., Jr., and Koprowski, H. (1986) **GD2 ganglioside biosynthesis is a distinct biochemical event in human melanoma tumor progression.** *FEBS Lett.* **208**, 17-22

Ullman, M. D., and Radin, N. S. (1974) **The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver.** *J. Biol. Chem.* **249**, 1506-1512

van den Hill, A., van Heusden, G. P. H., and Wirtz, K. W. A. (1985) **The synthesis of sphingomyelin in the Morris hepatomas 7777 and 5123D is restricted to the plasma membrane.** *Biochim. Biophys. Acta* **833**, 354-357

van Golde, L. M. G., Raben, J., Batenburg, J. J., Fleischer, B., Zambrano, F., and Fleischer, S. (1974) **Biosynthesis of lipids in Golgi complex and other subcellular fractions from rat liver.** *Biochim. Biophys. Acta* **360**, 179-192

Voet, D. (1992). **"Bioquímica"**. Edit. Ediciones Omega, S. A. Primera edic. Barcelona, España Pag.- 1161,1165-1168

Watanabe, R., Wu, K., Paul, P., Marks, D. L., Kobayashi, T., Pittelkow, M. R., and Pagano, R. E. (1998) **Up-regulation of Glucosylceramide Synthase Expression and Activity during Human Keratinocyte Differentiation.** *J. Biol. Chem.* **273**, 9651-9655

Werner, R. (1988). **" Fundamentos de bioquímica moderna"**. Edit. Acribia, S.A. Primera edic. España Pag.-121-123

Yang, Z., Costanzo, M., Golde, D. W., and Kolesnick, R. N. (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

Zhang, H., Buckley, N.E., Gibson, K., Spiegel, S. (1990) **Sphingosine stimulates cellular proliferation via a protein kinase C-independent pathway.** *J. Biol. Chem.* **265**, 76

Zyad, A., Benard, J., Tursz, T., Clarke, R., and Chouaib, S. (1994) **Resistance to TNF-alpha and adriamycin in the human breast cancer MCF-7 cell line: relationship to MDR1, MnSOD, and TNF gene expression.** *Cancer Res.* **54**, 825-831