



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA**



**DE MEXICO FES ZARAGOZA**

**NOMBRE:** *Martínez García Maria Reyna*

**NÚMERO DE CUENTA:** *402038412*

**AÑO EN QUE TERMINA LA CARRERA:** *Diciembre 2008*

**ORIENTACIÓN:** *Bioquímica Clínica*

*Expresión de los genes UGCG y MDR-1 en la resistencia a la toxicidad por ceramida en líneas celulares de CaCu humano*

**ÁREA ESPECÍFICA DEL PROYECTO:** *Biología molecular*

**DIRECTOR DE TESIS:** *Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias*

**ASESOR INTERNO:** *Q.F.B Carina Gutiérrez Iglesias*

**LUGAR DONDE SE DESARROLLO:** *Escuela Superior de Medicina IPN*

**OPCIÓN DE TITULACIÓN:** *Tesis experimental*



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.

# AGRADECIMIENTOS

## A DIOS

Pedí FUERZA para grandes logros,  
me diste debilidad para que aprendiera a obedecer

Pedí PODER para obtener las alabanzas  
del hombre me dio debilidad para sentir la  
necesidad de Dios

Pedí de todo para PODER disfrutar de la vida,  
me concedió la vida para poder disfrutar de todo

Pedí RIQUEZA para poder ser feliz,  
me dio pobreza para poder ser sabio

Pedí SALUD para hacer cosas grandes  
me dio enfermedad para poder hacer  
cosas buenas.

No pedí NACER... Y dios me dio una madre y un padre maravilloso  
No recibí nada de lo que pedí, pero me fue otorgado  
todo lo que necesite y me fueron concedidos todas las  
peticiones que nunca hice.

## **A MIS PADRES**

A mi mamá que es una mujer tan sabia, fuerte, con mucho carácter y muy noble, a la que admiro. Quiero agradecerle todo pero todo el apoyo, la comprensión que me ha brindado durante toda mi vida y cuando comencé la carrera.

A mi papá por enseñarnos, que la gente cambia con la ayuda de Dios y puede ser mejor cada día, por su apoyo y por saber escuchar, por estar en los momentos más difíciles y por comprenderme, gracias papá

A los dos Gracias por guiarme y enseñarme que la vida es hermosa y tenerme tanta confianza. los quiero.

A Jaime, Silvia, Héctor, Toño y Adriana gracias por estar conmigo, apoyarme y por ser mis hermanos.

Agradezco el apoyo de mi Directora de tesis la, Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias por su paciencia y comprensión.

A todos los chicos de maestría y doctorado.

Y al Doctor Ángel Miliar por su apoyo incondicional.

Un gran agradecimiento y reconocimiento a todos los que menciono y los que no gracias porque yo solo nunca lo hubiera logrado.

# Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b>	<b>6</b>
2.1 ESFINGOLIPÍDOS	6
2.2 ESTRUCTURA DE LA CERAMIDA	7
2.3 BIOSÍNTESIS DE LA CERAMIDA	8
2.3.1 Biosíntesis de « <i>novo</i> »	8
2.3.2 Generación de la ceramida en la hidrólisis de la esfingomielina	10
2.3.3 Formación de la ceramida por la vía de reciclaje o de salvamento	10
2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA	12
2.4.1 La ceramida como un segundo mensajero	12
2.4.2 Implicación en el destino celular	13
2.4.3 Diferenciación celular	16
2.4.4 La ceramida y detención del ciclo celular	17
2.5 MECANISMO DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS	17
2.6 EL GEN MULTIPLE DRUG RESISTANCE (MDR-1)	19
2.7 LA ENZIMA GLUCOSIL CERAMIDA SINTETASA	20
2.8 DEFINICIÓN DEL CÁNCER	22
2.8.1 Cáncer Cérvicouterino	22
2.9 EL HPV (VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO)	23
2.9.1 Relación del HPV y CaCu	23
2.9.3 Periodo de incubación	25
2.10 FACTORES DE RIESGO DEL CaCu	26
2.11 TRATAMIENTO O TERAPIA DE CaCu	27
2.11.1 Cirugías	27
2.11.2 Radioterapia	27
2.11.3 Quimioterapia	28
2.11.4 Inmunoterapia	28
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>29</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>30</b>
4.1 Objetivos particulares	30
<b>5. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>30</b>
<b>6. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>31</b>
6.1 Tipo de estudio que se realizará	31
6.2 Población	31
6.3 Criterios	31
6.4 Variables	31
<b>7. METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES (CaLo, CasKi y ViBo)	31
7.2 ELABORACIÓN DE CURVAS DOSIS RESPUESTA	32
7.3 EXTRACCIÓN DE RNA POR EL MÉTODO DEL TRIZOL	32
7.4 OBTENCIÓN DE cDNA A PARTIR DEL RNA (RETROTRANSCRIPCIÓN)	33
7.5 TÉCNICA DE LA PCR EN TIEMPO REAL	34

7.6 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	35
7.7 DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA.....	36
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>8.1 EFECTO DE LA CERAMIDA C6 EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS LÍNEAS CaLo CasKi Y ViBo (CURVAS DOSIS-RESPUESTA).....</b>	<b>37</b>
8.2 INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA EN PLACAS DE AGAROSA.....	39
8.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL POR CURVAS DE RANGO DÍNAMICO .....	40
8.3.1 Expresión relativa del gen constitutivo (housekeeping) en cada una de las líneas celulares .....	41
8.3 .2 Curvas de rango dinámico y amplificación de los genes UGCG y MDR-1 .....	<a href="#">44</a>
8.4 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN UGCG Y MDR-1 EN LAS TRES LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON CERAMIDA .....	45
8.5 ANÁLISIS DE VARIANZA, DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS TRES LÍNEAS CELULARES. ....	45
<b>9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
9.1 EFECTO DE LA CERAMIDA EN LAS TRES LÍNEAS CELULARES .....	50
9.2 EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES MDR-1 y UGCG EN LÍNEAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO TRATADAS CON CERAMIDA .....	<a href="#">51</a>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>55</b>

## **RESUMEN**

La ceramida es considerada como segundo mensajero, ya que participa en la señalización de varios factores que inducen la proliferación, inhibición o muerte celular. *In vitro*, se ha demostrado que la ceramida inhibe la proliferación de las células tumorales infectadas con papiloma 18, sin embargo, en las células infectadas con otro tipo de HPV o sin infección no ha sido estudiado. Algunos reportes han sugerido un posible desarrollo de la resistencia a drogas en CaCu, y se desconoce si el gen MDR-1 (presente en cáncer de mama resistente a fármacos) e inclusive el gen UGCG (que metaboliza a la ceramida hacia una ceramida no tóxica) participen en la resistencia al efecto de la ceramida. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de los genes UGCG y MDR-1 en 3 líneas celulares derivadas de cáncer Cervicouterino (CaCu) tratadas con ceramida. Se realizaron curvas dosis respuesta en las 3 líneas celulares de CaCu. Posteriormente se aisló el RNA por el método de trizol, y se utilizó el método de RT para la obtención de cDNA. Por último, mediante la técnica de PCR en tiempo real se midió la expresión relativa de MDR-1 y UGCG en células tratadas y no tratadas. Los resultados mostraron que la dosis media letal de ceramida para CaLo y CasKi, fue de 2.5  $\mu$ M, con una inhibición de la proliferación del 60%, mientras que en ViBo, se necesitó una dosis mayor (10  $\mu$ M) para inhibir el 40% de la proliferación, lo que sugiere la resistencia a la ceramida por las células ViBo. En los resultados de la PCR en tiempo real, se observó que CaLo y ViBo presentaron una expresión del MDR-1 y UGCG significativamente mayor, aunque ViBo mostró los niveles de expresión más altos. Por lo tanto, este trabajo demuestra que en células derivadas de CaCu se presenta un fenómeno de resistencia a la ceramida y lo hace a través de la vía de la glucosilación de dicho lípido para evadir el efecto apoptótico, así como una sobreexpresión del gen MDR-1.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las primeras causas de muerte en todo el mundo con un total de 58 millones de fallecimientos al año (World Health Report 2005). De éstos más de 238 mil mueren a causa de CaCu. La Secretaría de Salud (SSA) ha informado que en México mueren al año 60 mil personas de cáncer, correspondiendo al 14% a cáncer de cérvix. Por esta razón es urgente la búsqueda de nuevas alternativas antineoplásicas, y la descripción de los mecanismos relacionados a la evolución tumoral, para diseñar estrategias terapéuticas.

Un aspecto abordado por diferentes autores es la investigación del metabolismo de los esfingolípidos presentes en el cáncer, ya que se ha encontrado que estos lípidos intervienen en una serie de actividades moleculares altamente reguladas que inducen procesos de muerte o proliferación celular. Las moléculas bioactivas que más se han estudiado son las bases esfingoides: ceramida y esfingosina 1-fosfato (Hannun, YA and Lina, M. O 2002).

Uno de los procesos más estudiados con relación a la participación de los esfingolípidos en el cáncer, es el metabolismo de la ceramida, la cual regula varios procesos de proliferación y apoptosis. Se propone que en el cáncer este equilibrio se modifica provocando la proliferación de las células cancerosas. Un ejemplo muy claro es cuando la esfingosina 1-fosfato o glucoesfingolípidos se acumulan en la célula, y esto provoca una proliferación descontrolada la cual es característica del cáncer (Radín, N 2003). Por otro lado se ha relacionado la resistencia a drogas con el aumento de algunos esfingolípidos como la galactosil ceramida, ceramida 1fosfato y glucosil ceramida (GC). Esta última puede ser glucosilada por la glucosil ceramida sintetasa (GCS), convirtiéndola en glucosil-ceramida y lactosil ceramida (LacCer), (derivados que ya no tienen actividad

proapoptótica). Se ha propuesto que este mismo mecanismo lo utilizan las células cancerosas resistentes a drogas para evadir la toxicidad de la ceramida o cualquier factor tóxico. Se ha encontrado que en algunos tipos de cáncer resistentes a drogas como antraciclinas, adriamicina, cisplatino, vinblastino y paclitaxel (Kok, JW et al 2000), se encuentran aumentados los niveles del gen GCS, por lo que se sugiere que en el desarrollo de la multirresistencia a drogas, la enzima glucosil ceramida está sobre expresada en las células que no responden a fármacos ya que la multirresistencia a drogas se desarrolla mediante distintos mecanismos, de los que no puede descartarse la disfunción del metabolismo de las enzimas que regulan a la ceramida.

La mayoría de estas enzimas han sido poco estudiadas, y se cuentan con pocas herramientas moleculares y farmacológicas para investigar a estas vías y sus funciones (Hannun, YA and Lina, MO 2002). Por lo anterior, es necesario desarrollar metodologías que permitan el estudio de la participación de los esfingolípidos en el cáncer.

Se ha documentado que los altos niveles del gen GCS aumentan la expresión de MDR-1 en células cancerosas de mama, colon y próstata, los altos niveles de GC aumentan la expresión de MDR-1. Por lo tanto, es prioritario investigar el papel de la ceramida y el gen MDR-1 en la multirresistencia a drogas (Gouazé, A V. 2007).

En el caso del CaCu, no se ha estudiado: la participación de la ceramida en la multirresistencia a las drogas, y tampoco, si los genes GCS y MDR-1 están involucradas en dicho efecto (en caso de presentarse dicha resistencia), por lo que se propone en este trabajo evaluar la expresión de ambos genes en células tumorales obtenidas mediante cultivos *in vitro*.

## 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.1 ESFINGOLÍPIDOS

Los esfingolípidos son los lípidos de la membrana que incluyen en su estructura a las denominadas bases esfingoides, conocidas también como bases de cadena larga o esfingosinas. (Pruett SH et. al, 2008). Fue Johann Thudichum (1884) quien acuñó el término «*sphingosin*» en alusión a las enigmáticas propiedades de los lípidos aislados de extractos del cerebro (Thudichum, JLW 1884) y medio siglo más tarde, fueron caracterizados estructuralmente por Herb Carter (1947). Este investigador propuso la denominación de esfingolípidos para los lípidos que derivan de la esfingosina (Pruett, SH et. al. 2008).

En el grupo de los esfingolípidos, con un número superior al millar de moléculas actualmente identificadas, se incluyen: la esfingomielina, los cerebrósidos y los gangliósidos: Todos ellos son moléculas anfipáticas, con una cabeza polar y dos radicales fuertemente hidrofóbicos, característica que también hace alusión a la esfinge, (mitad mujer mitad león), que según la mitología griega, devoraba a quien no descifraba sus enigmas. Los esfingolípidos se consideraron hasta hace aproximadamente dos décadas como sólo integrantes estructurales y estáticos de las membranas biológicas. Actualmente, se han caracterizado a los esfingolípidos de las células eucariotas como componentes funcionales y dinámicos, que además de cumplir una función estructural (Futerman, AH y Hannun, YA 2004), intervienen diferentes efectos biológicos a través de su transducción de señales (Dickson, RC 2008) y del transporte intracelular entre las membranas.

Los esfingolípidos desempeñan funciones cruciales en el destino de la célula, ya que participan en la muerte o supervivencia de ésta y son factores determinantes en la iniciación y progresión de las enfermedades degenerativas (incluyendo el cáncer), por lo tanto influyen decisivamente en la eficacia de las terapias antineoplásicas (resistencia a drogas) (Ruckhäberle, et al el 2008 et al; Merrill, AH. 2002).

## 2.2 ESTRUCTURA DE LA CERAMIDA

La ceramida es considerada un segundo mensajero debido a que diversos agentes fisiológicos como (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1) y farmacológicos, inducen un incremento de la ceramida intracelular y esto hace que se regulen los procesos de muerte, proliferación celular, diferenciación, senescencia, inflamación y transformación (Zheng, W. et al, 2006).

En el aspecto bioquímico se le asigna el nombre de ceramida (Cer), a las aminas formadas por un ácido graso y un esfingol (Fig1). La mayoría de los esfingoles están compuestos por la esfingosina y esfingonina (Radin, 2001). La ceramida (N-acil esfingosina) es la molécula bioactiva del metabolismo y precursora de esfingolípidos complejos como los cerebrósidos: glucosil ceramida (GC), galactosil ceramida (Galcer), lactosil ceramida (lacCER) y de diferentes gangliósidos (Hanada, K 2003; Birbes, H. 2002).

La síntesis de la ceramida ocurre en el retículo endoplasmático liso, que es el lugar donde se biosintetizan todos los lípidos. Posteriormente la ceramida se transfiere al complejo de Golgi mediante el transporte vesicular o con la intervención de la proteína transportadora de ceramida, en un proceso dependiente de ATP (Perry RJ. y Ridgway ND, 2005). Dicha proteína tiene varios dominios moleculares de unión para realizar la transferencia los lípidos que son hidrofóbicos. (Perry RJ y Ridgway ND, 2006; Futerman AH. y Rietzman, H 2005).

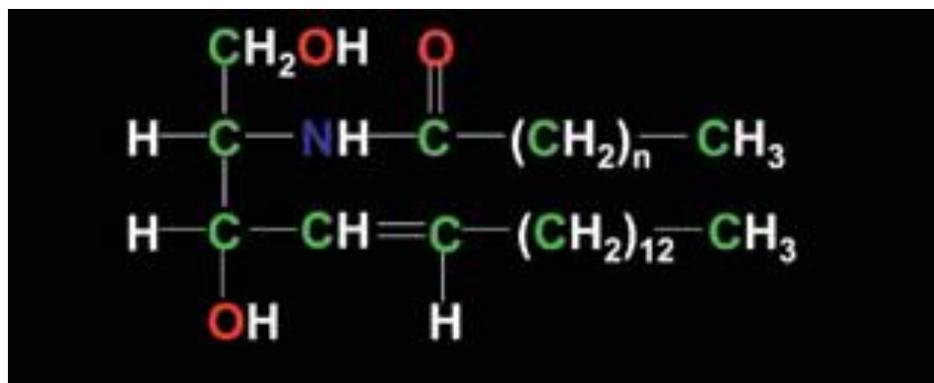


Figura 1. Estructura de la ceramida

## 2.3 BIOSÍNTESIS DE LA CERAMIDA

La ceramida no solo tiene su origen en el retículo endoplásmico, existen otras rutas que producen a la ceramida en el citoplasma. Dicho lípido se origina por tres vías principales: a) **biosíntesis de novo**, donde la ceramida se sintetiza a partir de precursores sencillos, b) **hidrólisis de la esfingomielina**, que es la síntesis regulada por diferentes esfingomielinasas y c) la denominada **vía de reciclaje o de salvamento**, en la que se produce la ceramida mediante la acilación de la esfingosina y otras bases esfingoides procedentes de la degradación de esfingolípidos más complejos. (Palacios, E 2008)

### 2.3.1 Biosíntesis de «novo»

Como ya se mencionó la síntesis de la ceramida se inicia en el retículo endoplasmático liso, a partir de la unión entre la serina y la palmitoil CoA (Fig. 2). Posteriormente, con la intervención de la serina palmitoil transferasa (SPT, enzima dependiente de piridoxal fosfato) (Merrill AH, 2002) se obtiene el metabolito 3-ceto-esfinganina, que es reducida a dihidroesfingosina (esfinganina) por la acción de la enzima es la 3-ceto-esfinganina reductasa. Esta molécula sufre una N-acilación que produce al dihidroceramida, la cual es un intermediario metabólico fisiológicamente inactivo, y se convierte en ceramida por la introducción de un doble enlace en posición *trans* entre los carbonos C4 y C5.

Los diferentes tipos de ceramidas que incluyen en su estructura a ácidos grasos específicos, tienen diferentes funciones en la fisiología y regulación de la muerte celular (Morales A et al, 2007). (Fig. 2).

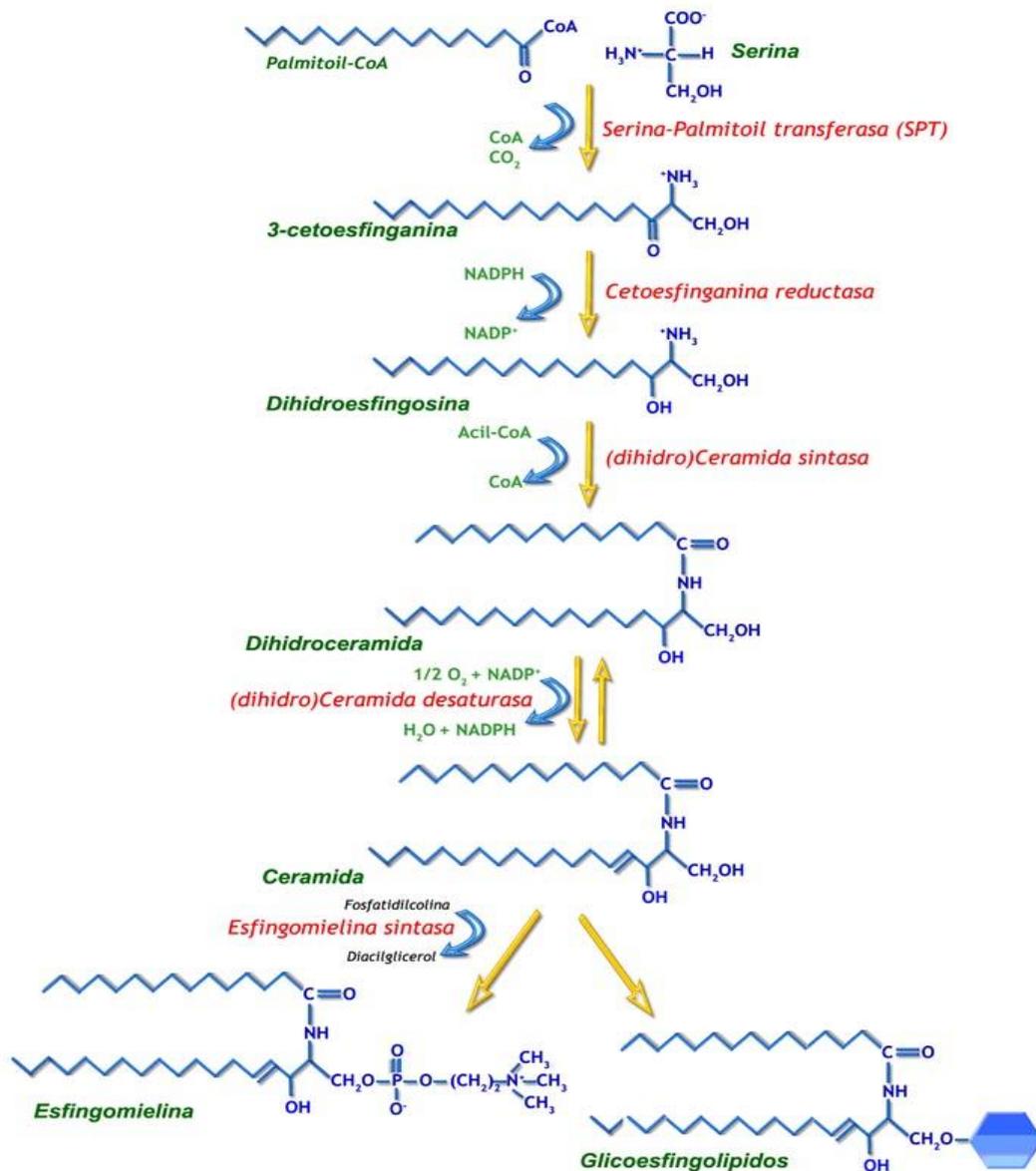


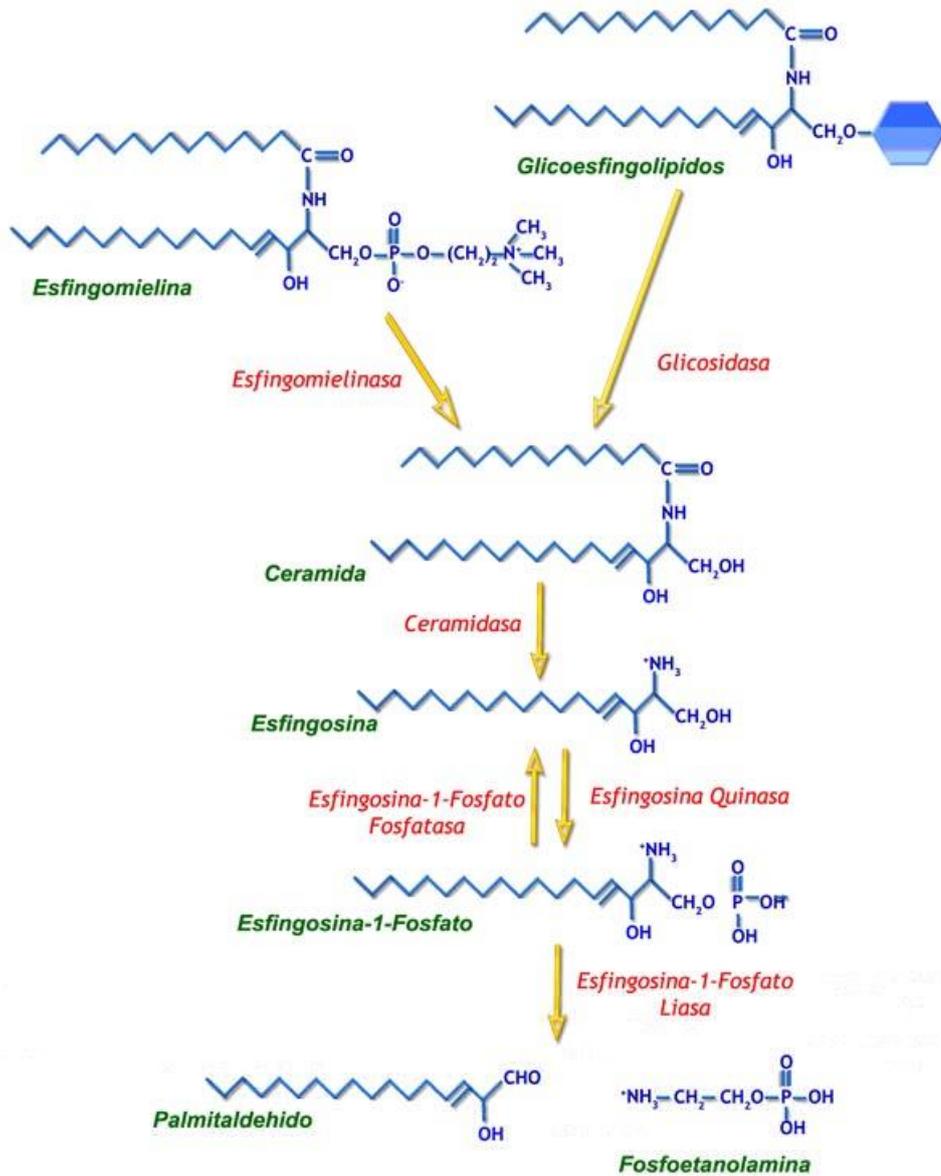
Figura 2. La síntesis de Novo de la ceramida. La serina y el palmitoil CoA se condensan y posteriormente, a través de una serie de reacciones se genera la dihidroceramida (producto biológicamente inactivo), la cual es trasformada a **ceramida**. Una vez que se produjo la ceramida, puede ser convertida en otros esfingolípidos bio-activos tales como esfingosina y esfingosina 1-fosfato (S1P), esfingomielina y glicoesfingolípidos complejos. (Tomado de N. Sterin, 2007).

### **2.3.2 Generación de la ceramida en la hidrólisis de la esfingomielina**

Otra vía que se ha propuesto para la generación de la ceramida es por la hidrólisis de esfingomielina, la cual se lleva a cabo por la participación de una esfingomielinasa (EMAsa) (Palacios E, 2008). Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en la célula, y se han descrito al menos cinco subtipos diferentes de EMAsas de acuerdo al pH óptimo de acción, por su localización subcelular y a su dependencia de cationes. Entre estos subtipos se incluyen la EMAsa neutra (nEMAsa), dependiente de magnesio, y actividad asociada a la membrana, y por otro lado la EMAsa ácida (aEMAsa), dependiente de zinc presente en los lisosomas y por último se encuentra una EMAsa alcalina. (Marchesini and Hannun, 2004). A pesar de los intensos estudios basados en el mecanismo para la activación de estas EMAsas, su papel específico no está totalmente claro. La nEMAsa y la aEMAsa han sido las más estudiadas, ya que ambas enzimas pueden ser activadas por el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) de 55KDa, así como por otros estímulos como el estrés. „

### **2.3.3 Formación de la ceramida por la vía de reciclaje o de salvamento**

En esta ruta se origina a la ceramida mediante la acilación de la esfingosina y de otras bases esfingoides, procedentes de la degradación de esfingolípidos complejos. Investigaciones recientes señalan la importancia de una nueva vía de síntesis de la ceramida llamada la “**ruta de recuperación**” o de “**salvamento**” (Fig. 3), en el metabolismo y función de la ceramida, en cuya vía intervienen, además de las esfingomielinasas, varias cerebrosidasas, ceramidasa y ceramida sintetasas, e incluso se ha descrito en esta vía la participación de la esfingosina-1-fosfato fosfohidrolasa y de la esfingosina cinasa 2 (Le Stunff H et al, 2007). La *vía de salvamento*, a través de la formación de su metabolito esfingosina 1-fosfato (ES-1P), controla la cantidad de ceramida que se forma mediante la biosíntesis *de novo* y modula las señales dependientes de este esfingolípido (Nieto FL, et al 2008).



**Figura 3.** Vía del reciclaje de la ceramida (tomado de \_Sterin N, 2007). La vía de reciclaje, involucra la hidrólisis de esfingolípidos complejos (esfingomielina) por acción de esfingomielinasas. La degradación de los esfingolípidos complejos es gradual.

## 2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 2.4.1 La ceramida como un segundo mensajero

La ceramida es un segundo mensajero, que produce en respuesta a diversos estímulos y es capaz de regular funciones vitales en las células a través de la modulación de numerosas vías de transducción de señales (fig. 4). Algunos autores han descrito que su principal función es ser una molécula señalizadora en la detención del ciclo celular y la inducción de la apoptosis (Morales A, 2007).

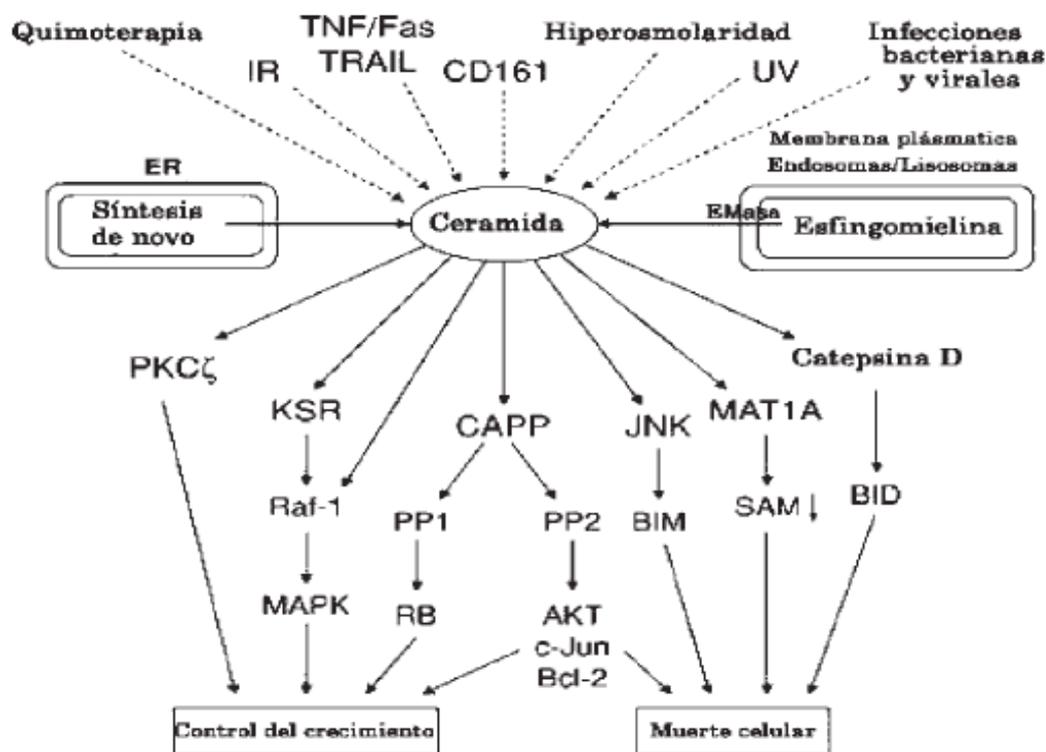


Figura 4 La función de la ceramida como segundo mensajero. En la respuesta a estímulos de estrés (quimioterapia, irradiación, ligandos de muerte, infecciones bacterianas y virales) se produce ceramida, esfingolípido que actuando sobre sus proteínas dianas activa cascadas de señalización implicados en el control del crecimiento y en la muerte celular (tomado de Morales A, 2007).

El término de segundo mensajero, se refiere a que cuando se genera ceramida (por la vía *de novo* o por la *hidrólisis de la esfingomielina*), ésta regula diferentes mecanismos, incluyendo a la señalización apoptótica. Se ha descrito que diferentes agentes extracelulares, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), ligandos de Fas (FasL), interleucina-1 (IL-1), óxido nítrico (NO), factor de crecimiento nervioso (NGF), agentes quimioterapéuticos, vitamina D<sub>3</sub>, calor, radiación, infección por VIH y senescencia celular son los que generan ceramida (Riebeling CM, 2003 et. al). El aumento en la concentración intracelular de la ceramida, induce una serie de respuestas celulares relacionadas con el control del crecimiento (proliferación, diferenciación o muerte celular), esto deriva cascadas de señalización donde se incluye a una serie de dianas directas de la ceramida (Fig. 5), entre las que se encuentran: la proteína kinasa C subtipo zeta (PKC  $\zeta$ ), proteína kinasa supresora de Ras (KSR), proteínas fosfatasa 2A (PP2A), 1B (PP1) y catepsina D. Estas dianas bioquímicas actúan a su vez, sobre otras que finalmente contribuyen a la modulación del control del crecimiento y de la muerte celular (Morales A, 2007).

#### **2.4.2 Implicación en el destino celular**

Como se mencionó, una importante función biológica de la ceramida es su intervención en el destino celular, (regulación del crecimiento y de la muerte), los cuales son muy complejos, las enzimas que participan en su metabolismo, deben estar estrictamente reguladas para asegurar el equilibrio muerte/supervivencia de las células. El destino de las mismas, viene regido por el equilibrio entre la ceramida y sus metabolitos. La ceramida se ha referido como *lípidosupresor de tumores*, debido a su capacidad de inducción de muerte apoptótica para hacer a las células tumorales particularmente sensibles. Por ello, las enzimas que rigen el metabolismo de la ceramida se han convertido en dianas importantes en la lucha frente al cáncer. Los metabolitos directos de la ceramida, esfingosina, ceramida 1-fosfato, glucosil ceramida y galactosil ceramida, moléculas bioactivas con efectos diferentes e incluso opuestos a los propios de la ceramida, con los que tiene un dinámico intercambio y que son potencialmente importante en el control de la sobrevivencia y muerte celular, ya que activan rutas encaminadas a inducir

muerte celular necrótica y/o por autofagia. Esta última es un proceso donde la célula digiere partes de sí misma; un ejemplo de esto son defectos genéticos o infecciones intracelulares. La esfingosina activa las vías de muerte necrótica, pero su derivado fosforilado esfingosina 1-fosfato, así como la ceramida 1-fosfato, inhibe las vías apoptóticas y activa las mitogénicas (Hervé LS et al, 2002). Otro ejemplo es el del grupo de los glucoesfingolípidos donde se incluyen gangliósidos que modulan positivamente las vías apoptóticas, mientras que algunos cerebrósidos como la *psicosina* (galactosil esfingosina) inducen la muerte celular por autofagia (Gouazé- Andersson V et al, 2007, Ségui B, 2006). La glucosil ceramida y lactosil ceramida, por carecer de actividad proapoptótica, están implicadas en el desarrollo de la resistencia a los fármacos utilizados en la quimioterapia convencional antineoplásica (fig.5) (Gouazé- Andersson V. 2007; Ségui B. 2006).

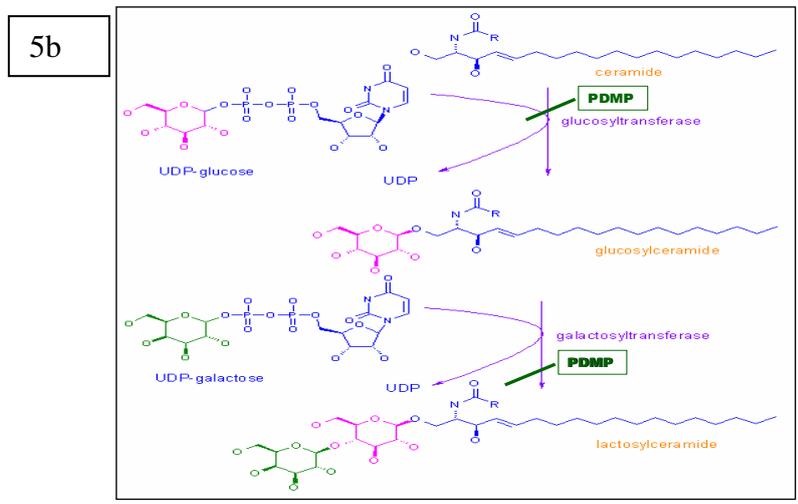
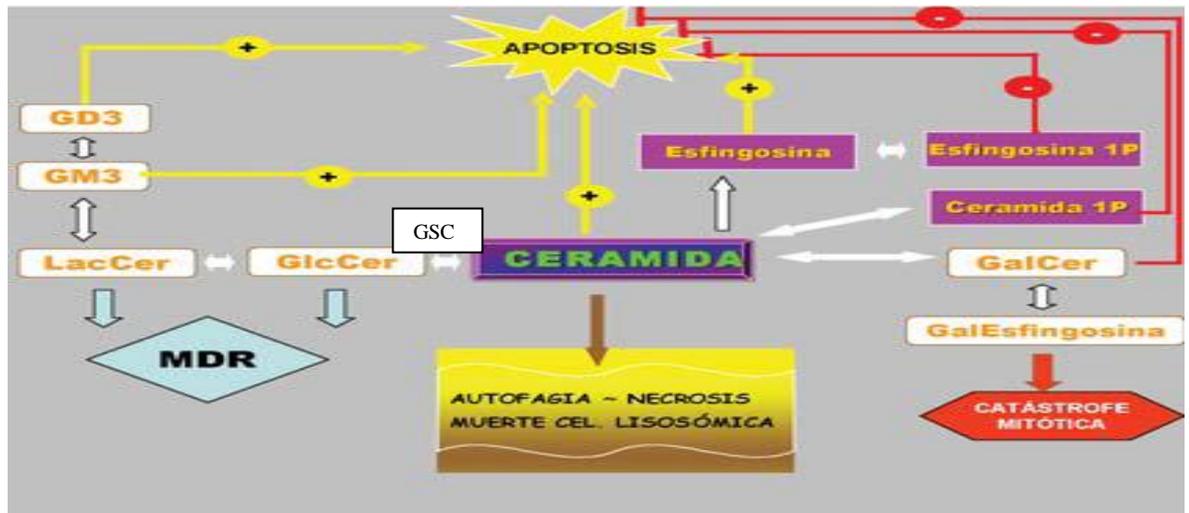


Figura 5a. Implicación de la ceramida en los procesos apoptóticos y proapoptóticos. La ceramida como tal en forma de esfingosina, gangliósidos GM3 o GD3, promueve la apoptosis de las células, mientras que la esfingosina 1-fosfato, ceramida 1 fosfato o galactosilceramida (Gal) actúan como factores antiapoptóticos. En algunas ocasiones, estos lípidos pierden la autoregulación y producen la resistencia cruzada a los fármacos (MDR). En otros procesos, la sobreproducción de la ceramida induce autofagia, necrosis y muerte celular lisosómica. Por otra parte, un descontrol en la transformación hacia galactosilceramida (GalCer) o galactosilesfingosina (GalEsfingosina), produce una catástrofe mitogénica, es decir, un efecto de proliferación descontrolada que llega a producir el aumento de la proliferación celular, incluso el desarrollo de un cáncer. En la fig. 5b se observa la transformación de la glucosilceramida y de la lactosilceramida por sus enzimas específicas. Estas transformaciones pueden ser bloqueadas por el inhibidor 1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propano (PDMP).

### 2.4.3 Diferenciación celular

Se ha visto que la ceramida C-2, un análogo soluble de la ceramida, (2 carbonos en la cadena grasa) por su número de carbonos estimula la diferenciación celular, inhibe la proliferación e induce la detención del ciclo celular en varios tipos de células (Massiello et al, 2004).

Algunos estudios han fundamentado que los esfingolípidos endógenos son requeridos para el crecimiento normal del cultivo de las neuronas Purkinje cerebelar, y que la esfingomielina (SM) está presente en abundancia en la región somato dendrítica de estas células, lo cual llevó a investigar los efectos de los esfingolípidos sobre la diferenciación y supervivencia de las células Purkinje inmaduras; en este estudio se utilizó a la ceramida y otros esfingolípidos para antagonizar estos efectos y se determinó que la ceramida es un requisito para la supervivencia y diferenciación dendrítica de las células Purkinje (Furuya et al, 1998).

En otros estudios, han investigado la principal vía de la señal para apoptosis durante la fase temprana de la neurogénesis. La incubación de las células PCC7-Mz1 diferenciadas a neuronas y cultivos de fibroblastos tratados con una ceramida natural y una ceramida análoga C-2 y C-6, causaron apoptosis durante la diferenciación neural temprana *in vitro*, lo que mostró que la ceramida está involucrada en la apoptosis de las células neuronales ya diferenciadas (Herget et al, 2000).

Las proteínas "tau" asociadas a los microtúbulos juegan un papel importante en el establecimiento, mantenimiento y diferenciación en la morfología neuronal y sobre estas características la ceramida fue estudiada. Células neuronales PC12 diferenciadas y tratadas con una ceramida permeable (ceramida C-2), presentaron una significativa reducción en los niveles de la proteína tau. También al adicionar la ceramida C-6, se presentó una disminución significativa en los niveles de tau; este evento fue similar cuando se utilizó un inhibidor sintético de tau (calpain I) (Xie et al, 1997), por lo tanto, la ceramida juega un papel importante en la diferenciación de las células PC12 a través de la disminución de tau.

## 2.4.4 La ceramida y detención del ciclo celular

La ceramida induce detención del crecimiento celular, por una regulación negativa de la vía proliferativa Akt/PKB (fig. 7), a través de un doble mecanismo: a) con su unión a la PKC (Proteína Kinasa C), induce el acoplamiento de esta kinasa a la PKB (Proteína Kinasa B) y con ello la inactiva; b) activando a la PP2A que a su vez inactiva a la PKB por defosforilación. Ambos eventos finalizan en la detención del ciclo celular o del crecimiento (Fig. 8) (Bourbon NA, 2000; Hajduch E, 2008; Cazzolli R, 2001).

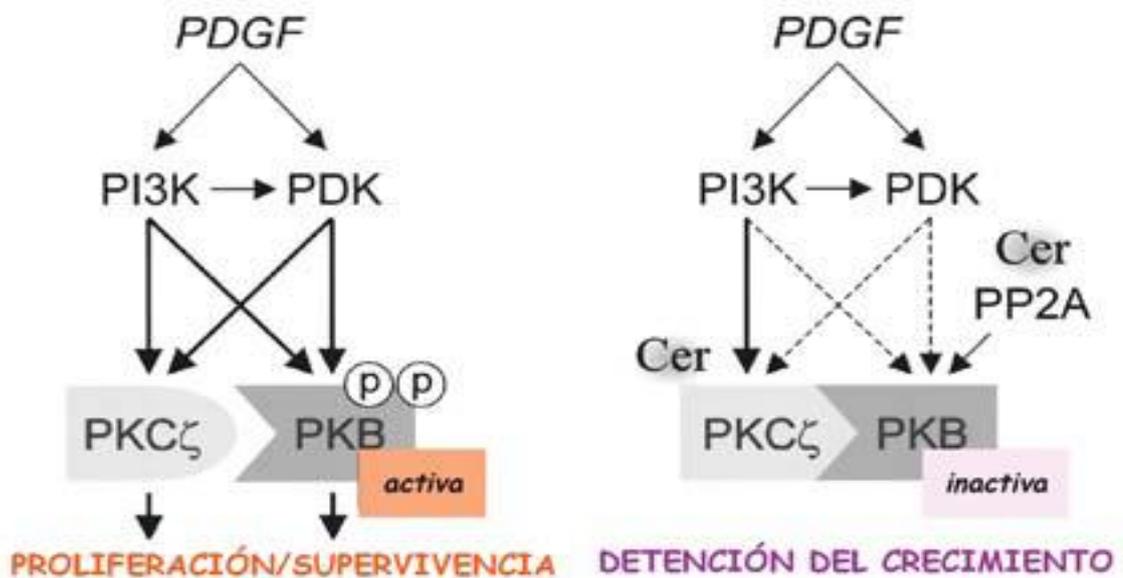


FIGURA 6. Regulación negativa de la vía de supervivencia Akt/PKB por la PKC zeta activada por ceramida y por la PP2A (las flechas con línea continua indican vías activas, mientras que las de línea discontinua, indican la inhibición de estas rutas. Tomado de Palacios E, (2004).

## 2.5 MECANISMO DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS

La resistencia a fármacos se define como la capacidad celular natural o adquirida para sobrevivir en presencia de los fármacos o drogas evitando sufrir daño alguno. En los últimos años, la resistencia a fármacos se ha convertido en un problema de salud pública. Y se han reportado numerosos casos clínicos en el caso del cáncer (Tsuruo,1997). La resistencia a fármacos ha sido estudiada en varios tipos de cáncer. Hoy en día, se sabe que su origen es multifactorial, donde intervienen numerosos mecanismos celulares, como por ejemplo: La PgP la cual forma un canal entre la membrana plasmática, permitiendo el transporte de drogas fuera de la célula, y en este proceso utiliza

la energía derivada de la hidrólisis del ATP (Fig. 9), de modo que no sean tóxicas a la célula (Ruiz MJ et al, 2002).

La expresión de PgP es considerada como un factor de riesgo importante para inducir la resistencia a drogas en diferentes tumores malignos humanos; por tal motivo, algunos tratamientos actúan bloqueando la actividad de la PgP, para obtener mejores resultados en la quimioterapia anticancerígena (Shabbits JA, Mayer LD 2002).

Por otro lado se ha propuesto que además de ser una proteína de transporte, la PgP actúa alterando o bloqueando la actividad de algunas caspasas y detiene la proliferación celular (Shabbits JA, Mayer LD 2002).

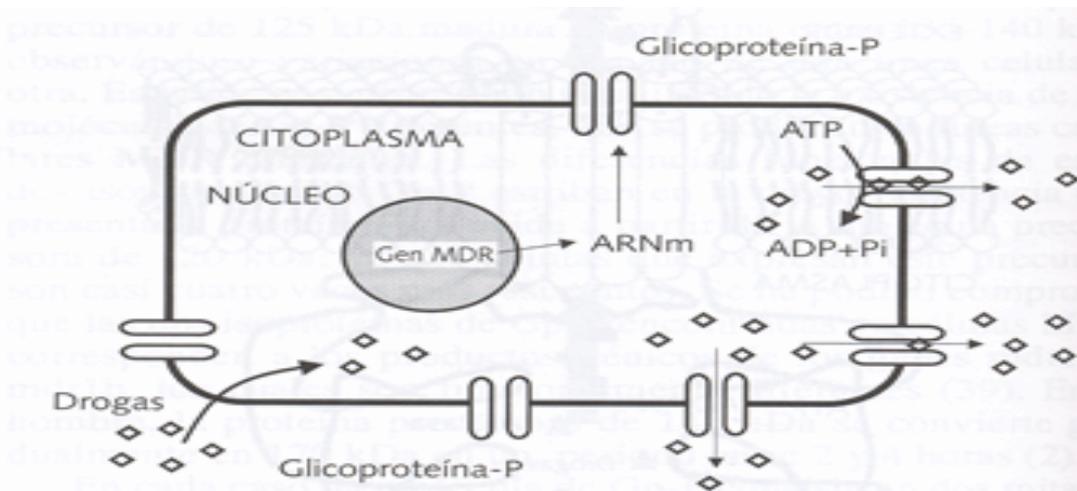


Figura.7 Resistencia mediada por glucoproteína PgP. Esta proteína se ubica en la membrana plasmática. Las drogas (rombos), que entran en la célula son inmediatamente expulsadas al exterior a través de canales que forma la PgP. El proceso se realiza gracias a la energía liberada en la hidrólisis del ATP ya que se ha visto que ViBo tiene mucha más capacidad mitocondrial, que justifica que entre más actividad mitocondrial, más ATP se produce y por lo tanto mayor actividad de PgP. Los inhibidores como el verapamil son capaces de bloquear este flujo, provocando una acumulación intracelular de droga y ocasiona el efecto contrario al de la PgP (Tomado de Ruiz MJ et al, 2002).

## 2.6 EL GEN MULTIPLE DRUG RESISTANCE (MDR-1)

El gen MDR-1 es un gen que se localiza en el cromosoma 7q21, dicho gen se compone de 1724953 pares de bases (bp), además de que cuenta con 26 zonas codificables (exones) y 25 zonas no codificables (intrones), y el transcrito (RNA mensajero) tiene 1759 pb (Genebank on line),(Fig. 10).

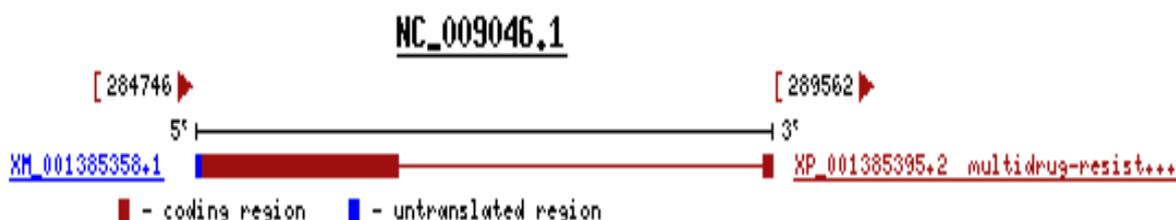


Figura 8. El Gen MDR-1. Se muestran las partes codificantes (ROJO) y no codificantes (AZUL) del gen MDR-1).

El aumento en la expresión de MDR-1 después de administrar una quimioterapia, se considera un factor que confiere resistencia a tratamientos contra el cáncer, y por esta razón, mas tarde puede presentarse la reincidencia del tumor. Actualmente, se ha descrito que existe una posible relación de la expresión del MDR-1 con la glucosilación de la ceramida, otro mecanismo implicado en supervivencia celular y que se abordará más tarde, aunque esto todavía no está claro (Gouazé- Andersson V, 2007).

Se ha documentado que los altos niveles de GC sintetizada a partir de ceramida aumentan la expresión de MDR-1 en células cancerosas de mama. Por lo tanto, se sugiere que el papel de la ceramida como mensajero de la respuesta citotóxica podría estar relacionado con la multiresistencia a drogas (Gouazé- Andersson V. 2007). En el CaCu, no se ha estudiado la participación de la ceramida en la multiresistencia a las drogas, y si los genes GCS y MDR-1 están implicados, por lo que es de importancia evaluar ambos genes en cultivos *in vitro*.

## 2.7 LA ENZIMA GLUCOSIL CERAMIDA SINTETASA

La (GCS) es codificada por el gen UGCG, localizado en el cromosoma 9q31 con 9 zonas codificantes (exones) y 8 zonas no codificantes (intrones) como se observa en la fig. 9. El gen está compuesto de 36234 pb para el DNA y para el transcrito 1637 pb.

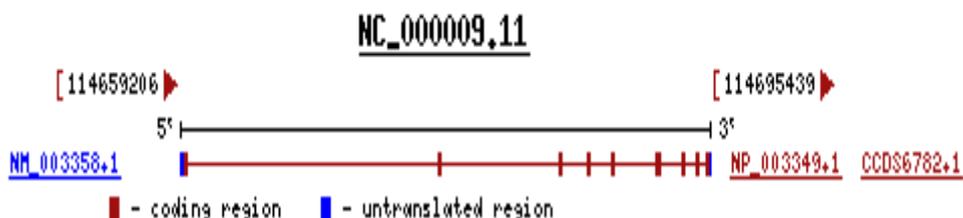


Figura 9. Estructura del gen UGCG. Se muestran las partes codificantes (ROJO) y no codificantes (AZUL) del gen UGCG

El complejo Golgi es el lugar principal para la biosíntesis de los esfingolípidos complejos; en su superficie, orientada al citoplasma, la ceramida se transforma en glucosil ceramida, esfingolípidos que constituye el núcleo estructural de un número superior a 300 moléculas de glucoesfingolípidos más complejos, algunos de ellos pro-apoptóticos y otros anti-apoptóticos.

La GCS de origen humano fue clonada en 1998 y hoy en día se sabe que cataliza la transferencia de glucosa desde su uridin-difosfato a la ceramida. Su centro activo se sitúa en la superficie citosólica de las membranas del complejo de Golgi, donde se dirige la ceramida para su glucosilación (Palacios E, 2008). (Fig. 10).

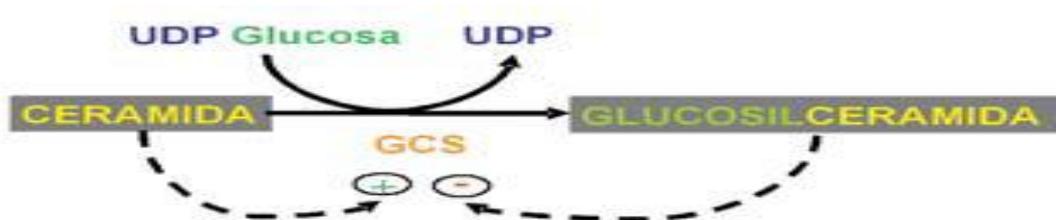


Figura 10. Se muestra como es glucosilada la ceramida en el Golgi, fenómeno que ocurre en la cara citosólica de Golgi. Este proceso es mediado por la UDPG (Tomado de Palacios E, 2008).

La glucosil ceramida (GC) se transfiere a otras membranas mediante el transporte vesicular en un mecanismo similar a los de la transferencia de proteína al Golgi-Membrana Plasmática (Van Helvoort A, 1997). Puede también, ser internalizada en las cisternas del Golgi, donde una galactosil transferasa la convierte de GC en lactosil ceramida (LacCer, luego las sialil transferasas mediante la adición de residuos de ácido siálico a galactosa, transforman a la lactosil ceramida en gangliósidos (GM3, GD3 y GT3), (Chatterjee S y Pandey A, 2008).

Aunque se ha logrado aislar a la ceramida sintetasa (GC), su enzimología y regulación molecular son escasamente conocidas. Se ha

involucrado a la GC, con las isoformas homólogas de las proteínas codificadas por el gen *LAG1* (gen1 que asegura la longevidad). (Riebeling C, 20, 2005).

Una acumulación de glucosil ceramida en la célula, se ve involucrada con la multirresistencia a drogas en el cáncer de ovario, seno, colon y en células epiteliales in vitro, pero en el cáncer Cervicouterino es desconocido. Farmacológicamente la glicosilación de la ceramida puede relacionarse con la resistencia al tratamiento de adriamicin y paclitaxel. Por otra parte, la transfección del gen GCS confiere resistencia a daunorubicin, doxorubin y TNF- $\alpha$  en el cáncer de mama (Liu et al, 1999; Ogretmen et al, 2001).

## **2.8 DEFINICIÓN DEL CÁNCER**

El termino cáncer en latín, que significa “cangrejo”, fue acuñado por Hipócrates en el siglo V a.c. para describir las enfermedades en la que los tejidos crecían y se diseminaban de manera descontrolada por todo el organismo, terminando con la vida del individuo. (Wayne, MB. et al 2007).

El cáncer es una enfermedad multifactorial que provoca daños o mutaciones al ADN y cambios no genéticos, que dan como consecuencia la formación de tumores. A pesar de que existen diferentes hipótesis sobre el cáncer, se acepta la del origen monoclonal, es decir, el tumor deriva de una sola célula (Karp G, 2006), luego la células se dividen de manera relativamente autónoma e incontrolada, conduciendo a un aumento progresivo del número de células en división, debido a que se pierde la capacidad para regular el crecimiento y la proliferación de manera ordenada en un tejido determinado; a este crecimiento se le llama neoplasia. Si sólo crece en un área delimitada y localizada se habla de un tumor benigno, que generalmente puede ser localizado y extirpado completamente por cirugía. Por el contrario, cuando las células de un tumor son capaces de invadir los tejidos circundantes o distantes, a través de su diseminación por el torrente sanguíneo o linfático, se considera un tumor maligno (metástasis), convirtiéndose en una gran amenaza para la salud. Entonces el cáncer se define como un crecimiento maligno capaz de diseminarse desde su localización original a otros sitios viajando principalmente por el torrente sanguíneo (Wayne, MB et al, 2007).

### **2.8.1 Cáncer Cérvicouterino**

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una alteración celular que tiene origen en el epitelio del cuello del útero. Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, y se relacionan por lo general con la presencia de HPV, (Virus del Papiloma Humano). La evolución de CaCu, se presenta en diferentes etapas, las cuales se diagnostican como displasia leve, moderada y severa. Posteriormente evoluciona a Cáncer *in situ*, cuando éste se circunscribe a la superficie epitelial, y luego progresa a Cáncer invasor cuando las células malignas traspasan la membrana, invadiendo otros órganos (Comisión nacional de cáncer cervicouterino).

## **2.9 EL HPV (VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO)**

El HPV es un virus DNA de doble cadena sin envoltura y simetría icosaédrica, con cápside de 72 capsómeros y de la familia Papovaviridae, que infectan preferencialmente las células epiteliales, donde crecen lentamente y se autoreproducen en el interior del núcleo.

Habitualmente, los HPV se dividen en cutáneos y mucosos. Los HPV cutáneos (tipos 1, 2 y 4) son los causantes de las verrugas comunes y plantares, que entre los más de 120 tipos de papilomavirus están identificados molecularmente. (Virus del papiloma humano, 2009)

La proteína E7 y E6 son las principales proteínas oncogénicas virales del HPV, las cuales se encuentran en el núcleo y/o citoplasma e inducen la proliferación celular. Ya que el virus se adueña de la maquinaria, dichas oncoproteínas interactúan con las diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular, provocando una proliferación excesiva, la cual es anormal en el cérvix.

### **2.9.1 Relación del HPV y CaCu**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud y los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos, el HPV es la causa de prácticamente todos los casos de cáncer de cuello uterino. En un estudio publicado en agosto de 1999 en (Journal of Pathology), se documentó que el

HPV está presente en el 99,7% de los cánceres de cuello uterino. Las investigaciones han confirmado que existe una estrecha relación causal entre el HPV y el cáncer de cuello de útero que es independiente de otros factores de riesgo.

- En estudios realizados se ha confirmado que la infección *persistente* por el HPV es la causa del cáncer de cuello uterino y que la prueba del HPV de alto riesgo puede predecir el riesgo de este tipo de cáncer, incluso en mujeres cuyos resultados de las citologías son normales (Palma, 2006).
- De los aproximadamente 150 tipos del HPV que se han identificado, cerca de 15 tipos de "alto riesgo" se han asociado con el cáncer (de los cuales 13 se consideran clínicamente los más importantes). Es preciso que haya infección persistente con estos tipos de alto riesgo para que se desarrolle el cáncer de cuello uterino.
- Sin embargo, la infección por el HPV por sí misma no es suficiente para provocar carcinomas, ya que los tumores malignos se desarrollan solamente si las lesiones inducidas por el HPV persisten durante varios años.
- La infección por el HPV puede permanecer latente durante muchos años. La mayoría de las mujeres eliminará la infección por el VPH a los 9-15 meses. No obstante, las mujeres que presentan infecciones persistentes por el HPV de alto riesgo tienen una probabilidad 300 veces mayor de desarrollar una lesión de alto grado (Pfister H, 1996).

### **2.9.2 Clasificación del HPV**

Se divide en 2 grandes grupos, dependiendo del riesgo que tiene desarrollar lesiones cancerígenas.

- HPV de Bajo riesgo. Son aquellos virus cuyo riesgo de producir cáncer es bajo; incluye a los virus que producen lesiones verrugosas genitales (condilomas acuminados) y son el HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57.

- HPV de Alto Grado: En este grupo están los virus que tienen alto riesgo de producir cáncer de cuello uterino y son el HPV 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58.

Es importante mencionar que el HPV 16 y 18 son los que con mayor frecuencia se vinculan al cáncer de cuello uterino. Esto depende en gran parte de las regiones geográficas del mundo en que se sitúe la población. (Diagnostico y tratamiento de cáncer cervicouterino, 2010).

De acuerdo a la clasificación de NIC, en la cual NIC se refiere a las células con múltiples grados de maduración y diferenciación en el epitelio cervical con morfología similares a las células cancerosas, histológicamente se han descrito la NIC I (displasia Leve), NIC II (displasia moderada) y NIC III (Displasia severa).

Bethesda en 1990 simplificó la clasificación donde histológicamente NIC I es lesión de bajo riesgo y NIC II/III son lesiones de alto riesgo. (IARC, 2009)

### **2.9.3 Periodo de incubación**

El periodo de incubación es variable, ya que puede ocurrir entre 2 a 3 meses, incluso algunos pacientes llegan a incubar los virus de 15-20 años. Esto se debe a que algunos pacientes sólo son portadores del virus, sin presentar sintomatología alguna, por ello los convierte en transmisores silenciosos importantes, y lo vuelve más peligroso, pues ignoran estar infectados hasta que su pareja es contagiada (Comisión Nacional de Cáncer Cervicouterino 2010).

La mayor parte de las lesiones son inaparentes y desaparecen también sin dejar evidencias de la infección, en un porcentaje muy reducido persisten por un determinado tiempo (10 %), que podrían evolucionar a lesiones precancerosas.

El virus puede estar en estado latente hasta 20 años, cuyas lesiones son asintomáticas, que solo pueden provocar prurito vulvar y/o vaginal. (Comisión Nacional de Cáncer Cervicouterino 2010).

## 2.10 FACTORES DE RIESGO DEL CaCu

### 1.- Conducta Sexual.

- Inicio precoz de la actividad sexual.
- El riesgo es mayor si se inicia relaciones sexuales más cerca de la menarca.
- Múltiples abortos y abortos espontáneos se asocian a HPV del tipo 16.
- El número de compañeros sexuales.
- Mujeres con 5 o más parejas sexuales eleva el riesgo del 69 al 83%
- Promiscuidad sexual del varón (Palma L, 2006).

### 2.- Consumo de tabaco.

- El tabaco es causante de displasia cervical por acción tóxica de la nicotina (Deacon JM, 2000)
- Los carcinógenos presentes en el tabaco dañan el ADN celular mitocondrial, que es precursor del cáncer. (Acladius NN, 2002)

### 3.- Inmunodepresión.

- Factores genéticos, que inducen carencia inmunológica.
- Síndrome de inmunodeficiencia humana (Jastreboff AM, 2002)

### 4.- Anticonceptivos.

- Ha sido reportado que el uso de anticonceptivos orales por más de 5 años es un cofactor que incrementa 4 veces el riesgo de padecer cáncer de cérvix en mujeres portadoras de VPH. (Bosch FX et al, 2002)

### 5.- Factores Nutricionales.

- Carencia en la dieta de antioxidantes.

- Deficiencia nutricional de ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, metionina y vitamina C, favorece la persistencia de la infecciones virales y la evolución a lesiones precursoras del cáncer. (Sedjo RL et al, 2002; Shannon J et al, 2002)

#### 6. Relaciones sexuales vía oral.

- Una investigación realizada recientemente revela que el epitelio de la boca es en el plano celular, de estructura muy semejante al epitelio vaginal y al del cuello uterino, por lo que se vincula con el HPV 16 y 18. (Palma L.2006)

#### 7. Alcohol.

- El mismo estudio del apartado anterior sostuvo que el ingerir alcohol y consumir tabaco promueven la infección por HPV. Se conoce que el etanol presente en las bebidas alcohólicas inhibe la producción de la proteína p53, lo que promueve la proliferación celular (Palma L. 2006).

## 2.11 TRATAMIENTO O TERAPIA DE CaCu

### 2.11.1 Cirugías

La cirugía curativa pretende eliminar el tumor primario con todas sus extensiones en una única operación, para que se elija dependerá del estadio clínico del tumor ya que se realiza en estadios tempranos, y el seguimiento dependerá de los hallazgos de cirujano en el curso de la operación. En estadios muy tempranos la criocirugía es el congelamiento que destruye células cervicales anormales es un procedimiento de escisión con un asa electroquirúrgica en lo que se realizará, extirpación de células cervicales anormales con una asa de alambre caliente. (The oral cáncer foundation).

### 2.11.2 Radioterapia

La radioterapia, actúa destruyendo el DNA de las células proliferantes malignas y normales, así impide que crezcan y se reproduzcan. Uno de los grandes problemas de esta terapia, es que los pacientes abandonan o no terminan el tratamiento por ser agresivo y no selectivo, los efectos secundarios son difíciles de llevar, además, se reporta en el Instituto Nacional de Cancerología de México que la sobrevivencia en tres años es de un 28.9% con

el tratamiento.

(The oral cancer foundation, 2010).

### **2.11.3 Quimioterapia**

El término quimioterapia se refiere a la administración de fármacos en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas y cuya función es impedir la reproducción de las células cancerosas. Dichos fármacos también se denominan medicamentos citotóxicos por que afectan a otras células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentran en división activa. Esta terapia antineoplásica tiene como limitación una escasa especificidad. El mecanismo de acción es producido a través de una alteración celular, ya sea bloqueando la síntesis de ácidos nucleicos, la división celular o la síntesis de proteínas. La acción de los diferentes fármacos varía según la dosis a la que se administre, por lo tanto, la quimioterapia tiene la propiedad de interferir con el ciclo celular, ocasionando la muerte de las células en división mitótica.

(Sociedad española de oncología médica, 2010).

### **2.11.4 Inmunoterapia**

Se refiere a un conjunto de estrategias de tratamiento con el propósito de modular el sistema inmunológico y así conseguir un efecto profiláctico o terapéutico.

La inmunoterapia del cáncer consiste en estimular el sistema inmunológico para rechazar y destruir tumores. En esta terapia se usan inyecciones de antígenos de paperas, candida o tricofitina para tratar las verrugas (tumores inducidos por el HPV). La inmunoterapia tópica utiliza una crema de mejora inmunológica, que es un productor de interferón que hace que las propias células T asesinas de los pacientes destruyan las verrugas, las queratosas actínicas, el cáncer de célula basal, el cáncer de célula escamosa, el linfoma cutáneo y el melanoma maligno superficial. (wikipedia).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se tienen antecedentes que el CaCu es la segunda causa de muerte en las mujeres mexicanas, y las alternativas de terapia que existen resultan agresivas, costosas y a largo plazo. Además de esto, algunos tipos de cáncer han mostrado ser resistentes a los tratamientos farmacológicos a los que se somete el paciente; esto influye en que aumente del crecimiento tumoral en el paciente, y que cuando se torna resistente, es más agresivo y mortal en poco tiempo.

Aunque el gen MDR-1 por excelencia es un gen relacionado a la fármaco resistencia en estudios *in vitro*, se ha demostrado que las células cancerosas resistentes a drogas anticancerígenas, presentan una acumulación de lípidos derivados de la ceramida que no son tóxicas a la célula, como son la Glucosil-ceramida (GC) y lactosil-ceramida (LacCer), las cuales son formas glicosiladas de la ceramida, y que promueven el desequilibrio entre los esfingolípidos.

En trabajos anteriores, se ha investigado el efecto de la ceramida en las células de CaCu CaLo, InBI y HeLa, encontrándose que éstas inducen toxicidad, aunque en un menor grado en HeLa por presentar resistencia. En este trabajo, se utilizaron tres líneas celulares que comprenden CaLo, CasKi y ViBo, y se estudió si en alguna de estas tres se presenta este fenómeno.

Dado que en el CaCu, no se ha descrito la participación de la ceramida en la multiresistencia a las drogas, así como la participación de los genes UGCG y MDR-1, se consideró que es importante evaluar ambos genes en cultivos de CaLo CasKi y ViBo tratados con ceramida.

Al describir los blancos moleculares de la resistencia a drogas, se podrá sugerir un pronóstico de resistencia a drogas, en función de la información molecular de cada paciente, para que en un futuro se puedan ofrecer tratamientos específicos y oportunos, con el fin de evitar el desarrollo de dicha

resistencia y mejorar así la calidad de vida e incluso preservar la vida de la paciente.

En caso de encontrar resistencia a la ceramida por parte de alguna de las líneas celulares tumorales, nos lleva a la siguiente pregunta: ¿se detectará una sobreexpresión de los genes GCS y MDR-1 en aquellas células que muestren resistencia a ceramida?

## **4. OBJETIVO GENERAL**

- Analizar la expresión de los genes GCS Y MDR-1 en las líneas celulares derivadas de CaCu: CaLo, CasKi y ViBo, tratadas con ceramida.

### **4.1 Objetivos particulares**

- Obtener los cultivos de las tres líneas celulares de CaCu: CaLo, CasKi y ViBo infectadas por HPV 18, HPV16 y negativo HPV.
- Determinar el efecto antiproliferativo de la ceramida en las tres líneas celulares.
- Obtener el RNA y cDNA de las tres líneas celulares tratadas y no tratadas con ceramida C6.
- Realizar PCR en Tiempo Real para cuantificar la expresión de los genes de GCS Y MDR-1.
- Analizar la expresión de dichos genes de acuerdo al grado de la toxicidad por ceramida C6 en las tres líneas celulares.

## **5. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Si en las células tumorales derivadas de CaCu tratadas con ceramida se observa una resistencia al efecto inhibitor de ésta, entonces habrá glucosilación de la ceramida, aumento del gen de la GCS y una sobreexpresión del gen MDR-1, por lo que se verá aumentada la expresión de ambos genes en las células que sean resistentes al tratamiento con ceramida.

## **5. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Si en las células tumorales derivadas de CaCu tratadas con ceramida se observa una resistencia al efecto inhibitor de ésta, entonces habrá glucosilación de la ceramida, aumento del gen de la GCS y una sobreexpresión del gen MDR-1, por lo que se verá aumentada la expresión de ambos genes en las células que sean resistentes al tratamiento con ceramida.

## **6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **6.1 Tipo de estudio que se realizará**

El estudio que se realizará es un estudio observacional, transversal y comparativo.

### **6.2 Población**

Tres líneas celulares derivadas de biopsias de cáncer Cérvico uterino.

-CaLo: infectadas con HPV-18

-CasKi: infectadas con HPV-16

-ViBo: Sin HPV

### **6.3 Criterios**

#### **Criterios de inclusión**

-Aquellos cultivos viables que tengan dos millones de células

#### **Criterios de exclusión**

-Cultivos contaminados o células no viables

#### **Criterios de eliminación**

-Líneas celulares que no sean CaLo, CasKi o ViBo

### **6.4 Variables**

- Tipo de línea celular
- Expresión relativa de los genes de GSC y de MDR-1

## **7. METODOLOGÍA**

### **CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES (CaLo, CasKi y ViBo)**

Las líneas celulares que se utilizaron para este estudio fueron las siguientes: CaLo (infectada con HPV-18), CasKi (infectada con HPV-16) y ViBo (negativo para el HPV). Las líneas celulares CaLo y ViBo se obtuvieron a partir de biopsias procesadas en el laboratorio de Biología Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM). La línea CasKi fue adquirida al ATCC en las condiciones ideales para cultivo.

Todos los experimentos se realizaron en condiciones estériles, utilizando botellas de cultivo Falcón, a una densidad 2 millones de células de cada línea celular por caja. Se les adicionó 10 mL de RPMI suplementado al 10% de suero fetal de bovino (Gibco, BRL, CA).

### **7.2 ELABORACIÓN DE CURVAS DOSIS RESPUESTA**

Se realizaron curvas dosis respuesta a diferentes concentraciones. Para evaluar el efecto de la ceramida (1-15  $\mu\text{M}$ ) (SIGMA)

1. Se cultivaron 10,000 células tumorales de cada línea celular en placas de 96 pozos, a cada pozo se adicionó cultivo de RPMI al 10% de suero fetal de bovino (Gibco, BRL, CA), y ceramida C6 diluida en etanol.

2. Como controles, se utilizaron solo etanol y células sin ningún tratamiento. La proliferación celular se evaluó a las 72 horas mediante la tinción con cristal violeta.

Después de que se obtuvieron las curvas dosis respuesta, se decidió utilizar las concentraciones de ceramida aproximadamente a la dosis letal 50% (DL50), como tratamiento para los experimentos que se realizaron posteriores, en donde CaLo y CasKi se trataron con 2.5 $\mu\text{M}$  y ViBo con 10 $\mu\text{M}$  de ceramida.

### 7.3 EXTRACCIÓN DE RNA POR EL MÉTODO DEL TRIZOL

Después de que fueron tratadas las líneas celulares a su concentración DL50 de ceramida, se prosiguió a realizar la extracción de RNA.

Se cultivaron en una incubadora (Siemens, EU) al 2% de humedad y al 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Después de dicho tratamiento, las células se lavaron en platos de cultivo dos veces con PBS y se lisaron 500 mL de Trizol (Invitrogen EU).

1. Se adicionó 100 µL de cloroformo a cada muestra, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm, obteniendo a una fase acuosa y una orgánica.

2. Fue colectada la fase acuosa en donde permaneció soluble el RNA, para precipitarlo se adicionaron 500µL de isopropanol, se incubó a 4°C durante 15 min y se centrifugó.

3. Se obtuvo un botón de RNA, el cual se lavó adicionó 1mL de etanol al 75% en agua de dietilpirocarbonato al 0.1% (agua de DEPC). Las muestra se resuspendieron en 20µL de agua DEPC y se incubaron a una temperatura de 56 -60°C, para ayudar a disolver el RNA obtenido. La integridad del RNA se observó en un gel de agarosa al 1% con el bromuro de etidio como revelador.

4. Se cuantificó la cantidad de RNA por el método espectrofotométrico. Al obtener las absorbancias de cada muestra se calculó la concentración a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración RNA (ng/}\mu\text{L)} = \text{DO}_{260 \text{ nm}} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{L} \times \text{Factor de dilución (999)}$$
$$\text{Pureza} = \text{DO a 260 nm} / \text{DO a 240 nm} \text{ aproximada a 1.8}$$

### 7.4 OBTENCIÓN DE cDNA A PARTIR DEL RNA (RETROTRANSCRIPCIÓN)

Después de obtener el RNA total, se utilizó el protocolo de retrotranscripción o RT, el cual es un proceso que implica la generación de una cadena de ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena a partir de un

ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple. Dicha actividad está mediada por la enzima retrotranscriptasa.

1. Se realizó una mezcla de reacción con 0.5 µL (400ng) de Random, 1µL (1mM) de dNTP (dATP, dGTG, dGTP dCTP), 12,5µL de agua, y al final RNA en una concentración de 150ng, esta mezcla de reacción se incubó a una temperatura de 65°C por 2 minutos.

2. Después se adicionó 2.5µL de Buffer 10X y DDTT, ambos a una concentración de 0.1N y por último se agregó la enzima M-MLV RT 200U. Se incubó durante 60 minutos a 37°C y por 2 minutos a 85°C. Al final se cuantificó por espectrofotometría.

## 7.5 TÉCNICA DE LA PCR EN TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o PCR en tiempo real, es utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (DNA). Para ello emplea la PCR en tipo real, del mismo modo que la PCR convencional.

1. En un termociclador LightCycler (Roche Diagnostics GMBH, CANADA) se midió la expresión de ambos genes con la ayuda de sondas tipo Tacman, además de cebadores específicos (sentido y antisentido), diseñados para los genes de estudio y para el de referencia (constitutivo) en este caso 18s, cuyas secuencias de los tres genes se observan en la tabla 1.

Tabla 1 Secuencia de los genes MDR-1, UGCG y 18s.

SECUENCIA	SENTIDO	ANTISENTIDO
18s	5'-CGAACGTCTGCCCTATCAAC-3'	5'-TTGGATGTGGTAGCCGTTTC-3'
UGCG	5'-GCTGCCTTACGTAGCAGACA-3'	5TCTTGGATGTGAAGTTCCAAAAT-3'
MDR-1	5'-ACAGAAAGCGAAGCAGTGGT-3'	5'-ATGGTGGTCCGACCTTTTC-3'

2. Todas las reacciones se realizaron en un bloque frío en el que se colocaron los tubos capilares (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) adicionándoles 9  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que contiene 0.1  $\mu\text{L}$  sondas tipo Taqman, y 0.5  $\mu\text{L}$  cebadores específicos (forward y reverse). A esta mezcla se le agrega el cDNA en una cantidad de 1500 ng/ $\mu\text{L}$ .

3. Después se introdujeron las muestras en un termociclador LightCycler (Roche Diagnostics GMBH, CANADA) para que el sistema informático procese las muestras con el siguiente programa: **Preincubación:** 95°C por 3 min, **Desnaturalización:** 95°C por 1 min, **Alineamiento** 60°C por 30s, **Extensión** 72°C por 5s, comenzar de nuevo con la amplificación 45 veces y Enfriamiento 4°C.

4. Al término de cada ciclo, el termociclador LightCycler proporcionó mediante un software el Ct de cada muestra. Después para evaluar estos datos se realizó un análisis monocolor en el cual se normalizó con el gen endógeno y los controles de cada muestra. Esto proporcionó cuantas veces se expresan los genes de interés con respecto al control, haciendo confiable la comparación entre los genes y proporcionando valores cuantitativos.

5. Una vez obtenidos estos resultados se llevó a cabo el análisis estadístico de ANOVA de una vía.

## 7.6 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se realizó una base de datos en Excel y SigmaPlot con los resultados de los estudios moleculares de cada línea celular. La variable cuantitativa se analizó por estadística inferencial para determinar la expresión del gen MDR-1 y GCS en tejido cervical de las tres líneas celulares mediante ANOVA de una vía con un intervalo de confianza del 95% y nivel de significancia  $p \leq 0.05$ .

## 7.7 DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA

En la figura 12 se puede observar el procedimiento general para analizar las muestras.

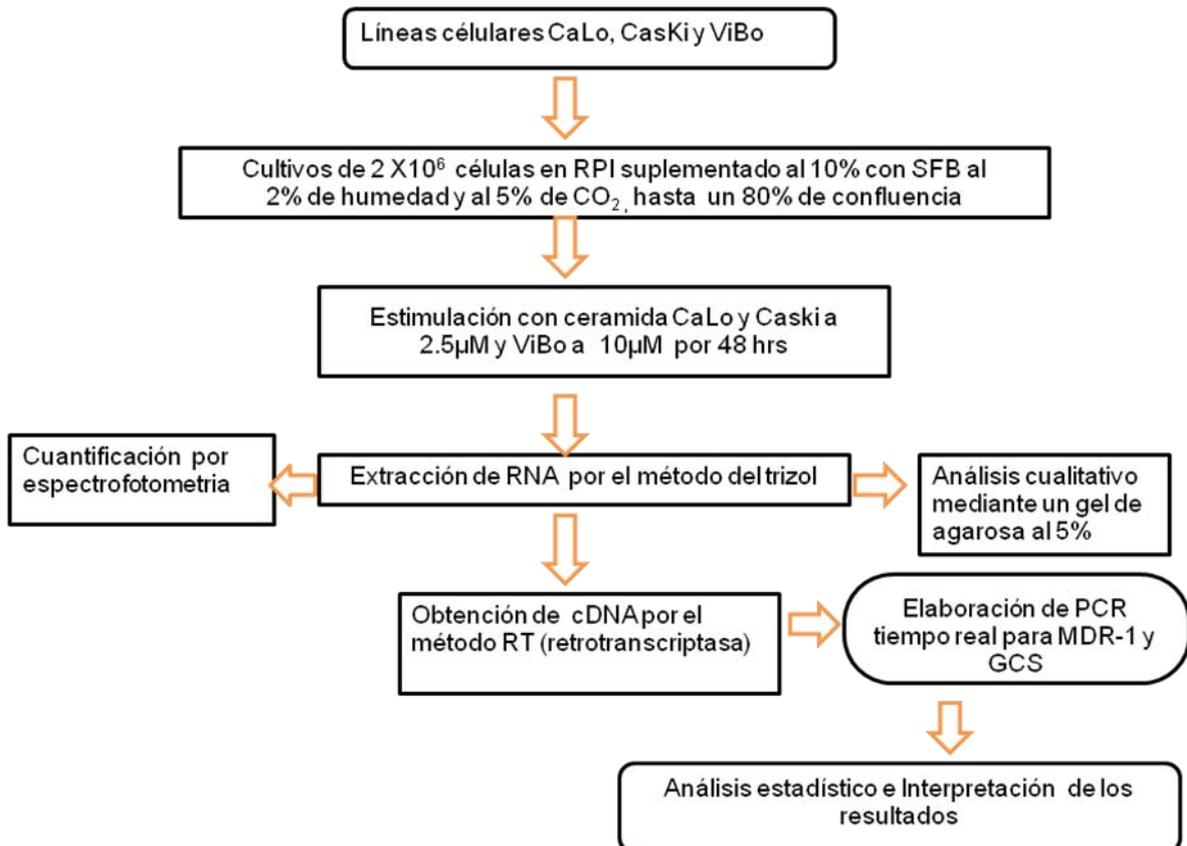


Figura 12. Diagrama de flujo que muestra el desarrollo de la metodología utilizada para este proyecto.

## **8. RESULTADOS**

### **8.1 EFECTO DE LA CERAMIDA C6 EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS LÍNEAS CaLo CasKi Y ViBo (CURVAS DOSIS-RESPUESTA).**

Para determinar el efecto de la ceramida en la proliferación de las células de cérvix humano, se cultivaron las líneas CaLo, CasKi y ViBo y se les adicionó ceramida C6 a diferentes concentraciones. La proliferación se evaluó a las 72 horas mediante la tinción de cristal violeta. Los resultados mostraron que la dosis media letal de ceramida para CaLo y CasKi fue de 2.5  $\mu\text{M}$ , con una inhibición de la proliferación del 60%, mientras que en ViBo, se necesitó una dosis mayor (10  $\mu\text{M}$ ) para inhibir el 40% de la proliferación, lo que sugiere la resistencia a la ceramida por las células ViBo. (fig.13 C). Por lo tanto, se decidió utilizar la concentración de 15  $\mu\text{M}$  en las tres líneas celulares para posteriores ensayos.

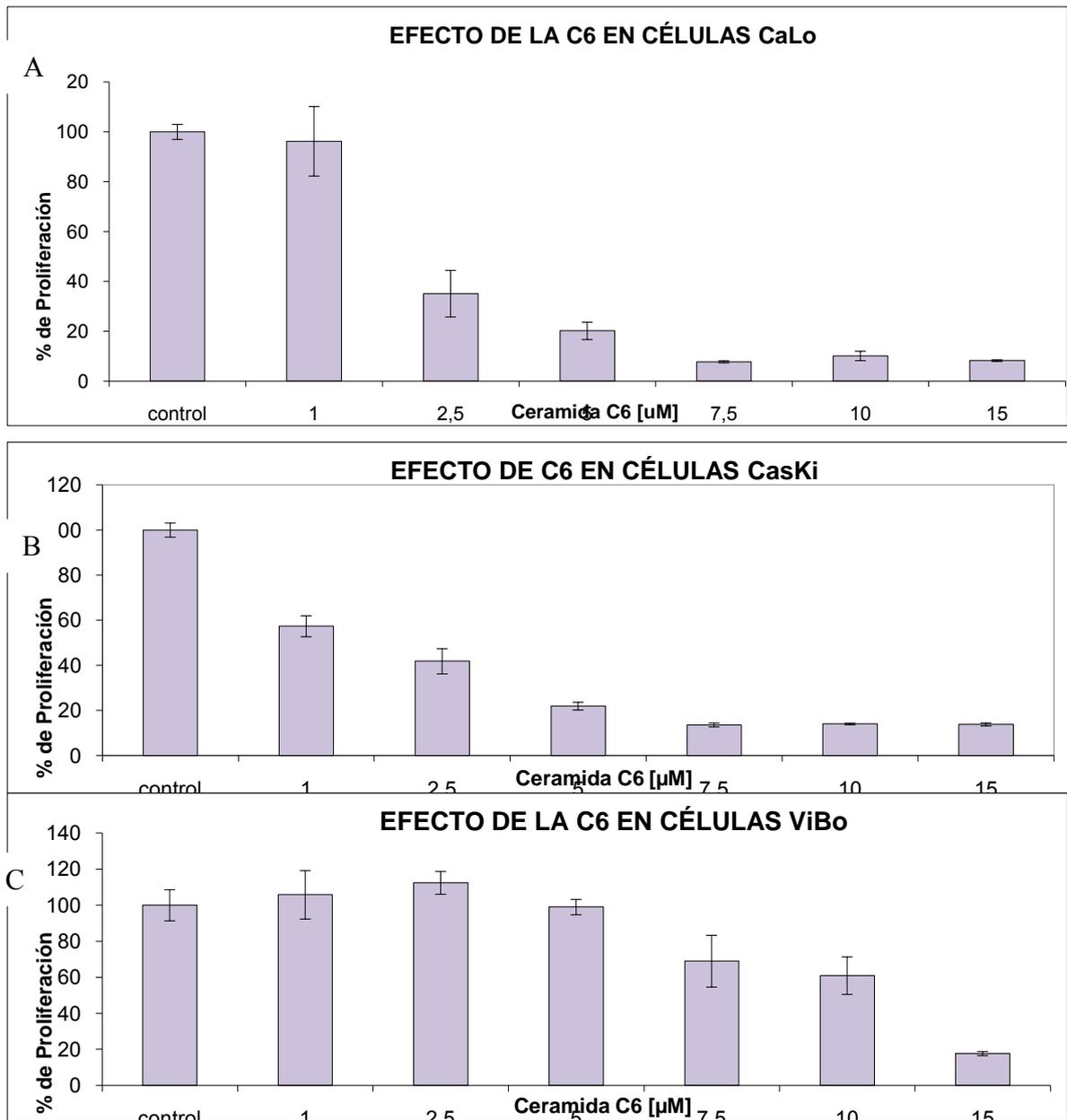


Figura 13. Efecto de la ceramida C6 en los tres cultivos celulares a diferentes concentraciones CaLo (A), CasKi (B) y ViBo (C). La proliferación celular se presenta como porcentaje de proliferación con respecto al control. Las concentraciones en unidades de micromoles son representados como ceramida C6  $\mu\text{M}$  y los valores promedio de 5 repeticiones con su desviación estándar.

## 8.2 INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA EN PLACAS DE AGAROSA

Se sembraron 2 millones de células en platos de cultivo y se les adicionó ceramida a la concentración que se decidió con el experimento anterior. Se cultivaron durante 72 horas a 37°C, después se lisaron las células y finalmente fue extraído el RNA por el método del trizol. Para observar la integridad del RNA total se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En la fig. 14 se visualiza un gel representativo de las muestras utilizadas para los experimentos posteriores, que fueron las que no mostraron degradación. Posteriormente estas muestras se cuantificaron por espectrofotometría y se obtuvieron concentraciones entre 700ng a 1700ng de RNA total.

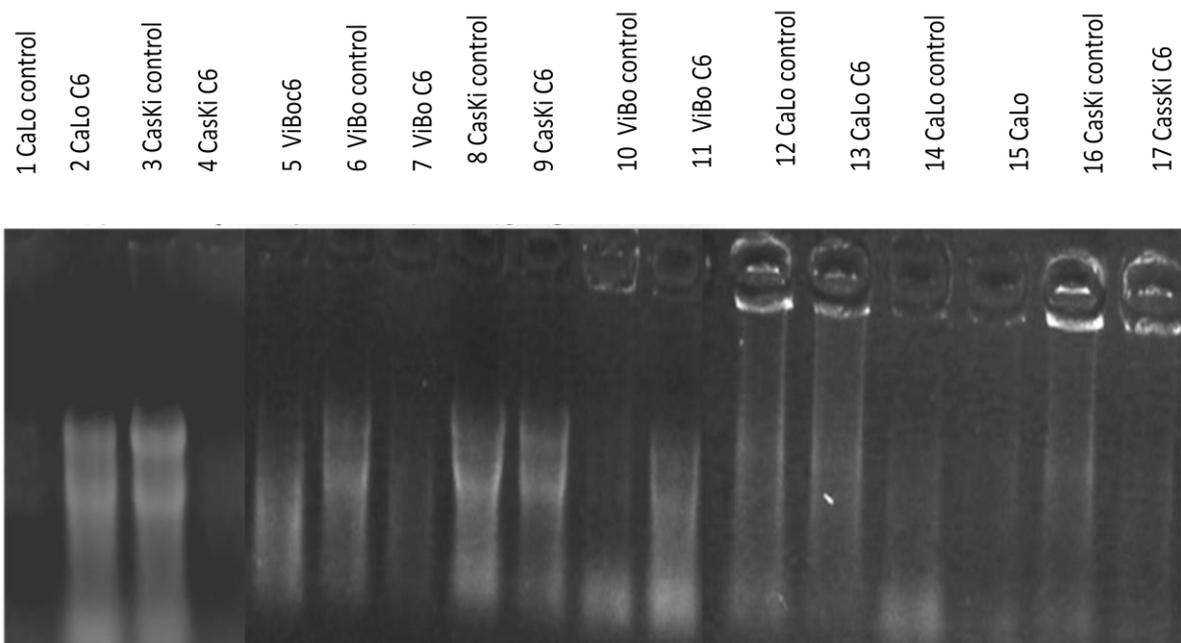


Figura 14. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% representativo de las muestras utilizadas para los experimentos posteriores, mostrando el RNA extraído de las tres líneas celulares con ceramida C6 como tratamiento y sin tratamiento (control) que se utilizaron para los experimentos.

Después de obtener el RNA total, se empleó el protocolo de retrotranscripción o RT, el cual se utilizó para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir del RNA. Después de obtener el cDNA se prosiguió a cuantificar por espectrofotometría, obteniendo cantidades de 110ng a 1100ng de cDNA y una pureza del 2.5 a 2.7, considerándose aceptable.

### **8.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL POR CURVAS DE RANGO DÍNAMICO**

Primeramente se realizó una prueba para comprobar el correcto funcionamiento de los oligonucleótidos iniciadores, la sonda, y con los resultados, se determinó la concentración adecuada a utilizar en los ensayos de expresión génica. Para este fin, se analizó la expresión relativa del gen UGCG en diferentes concentraciones de 3 muestras que presentaron suficiente material y sin degradación; la muestra 1: CaLo a una concentración 750 ng/ $\mu$ L, la muestra 9: CasKi a una concentración de 1020 ng/ $\mu$ L y la muestra 7: ViBo a una concentración de 110ng/ $\mu$ L.

El software que se utilizó para el análisis de la expresión fue el lighcycler 4 (Roche), el cual es un sistema que detecta el incremento de la fluorescencia en cada ciclo, registrando la información en gráfica de curvas de la cinética de reacción para cada una de las muestras.

En la figura 15, se muestra el ciclo inicial de amplificación (Cp) del gen UGCG en las tres líneas celulares. Las líneas CasKi y CaLo mostraron un Cp de 25 ciclos, mientras que en ViBo se detectó un Cp de 22 ciclos, (valor que se consideró adecuado para los análisis posteriores), por lo tanto, se decidió ajustar todas las muestras a 150ng/ $\mu$ L para el análisis de expresión.

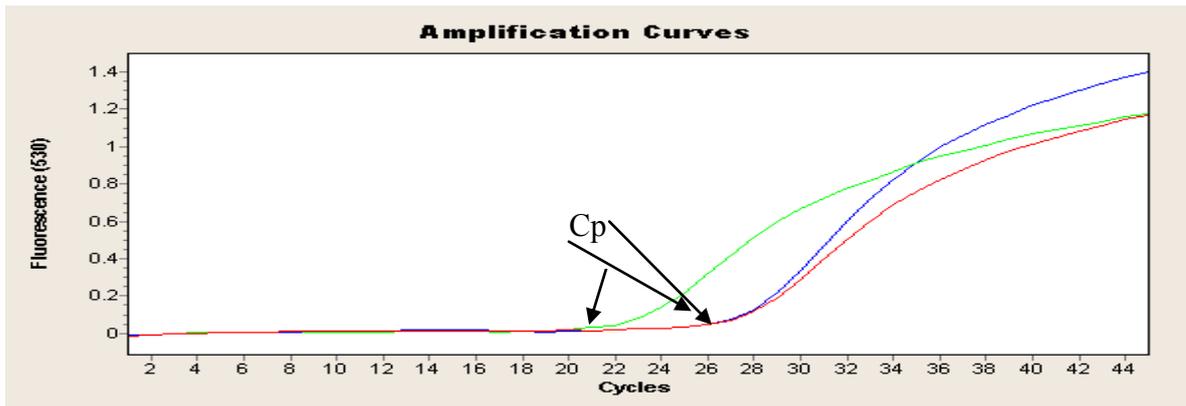


Figura 15. Expresión del gen UGCG durante 44 ciclos (cycles) en las tres líneas celulares. CaLo de color rojo a una concentración de 750 ng/μL, CasKi de color verde a una concentración de 1020 ng/μL y a ViBo a una concentración de 110ng/μL. Se observa en cada línea celular el ciclo en el que la expresión del gen comienza a ser detectada (cp); señalado con una flecha.

### 8.3.1 Expresión relativa del gen constitutivo (housekeeping) en cada una de las líneas celulares

Para los ensayos de la PCR se utilizaron como controles de expresión, genes que no cambian a través del tiempo o del tratamiento aplicado a las células o los tejidos, estas características los catalogan como patrones de comparación ideales para analizar si el gen que se busca aumenta o disminuye (housekeeping). En el laboratorio utilizamos el gen 18s para elaborar las curvas de rango dinámico como gen de referencia. Se eligieron 3 muestras al azar de cada una de las tres líneas celulares, se utilizaron a una concentración inicial de 150ng/μL y con las diluciones seriales de 1:10, 1:100, y 1:1000. Los resultados se muestran en la fig. 16.

En la figura 17, se observan las curvas estándar para el gen 18s en las tres líneas celulares, dichas curvas se construyeron utilizando el Cp y el logaritmo de la concentración que se obtuvo de las curvas de rango dinámico. Las gráficas mostraron una relación lineal entre los productos de la PCR y la concentración de cDNA, que se refleja en la eficiencia y error estadístico.

Para la curva estándar de CasKi, la eficiencia es 2.114 y el error es 0.0225, para CaLo la eficiencia es 2.059 y el error fue de 0.000907 y para ViBo la eficiencia de 2.067 con un error de 0.000998.

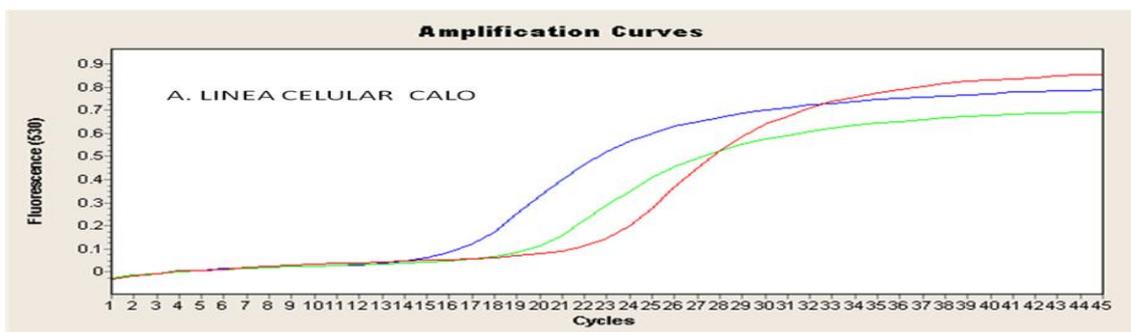
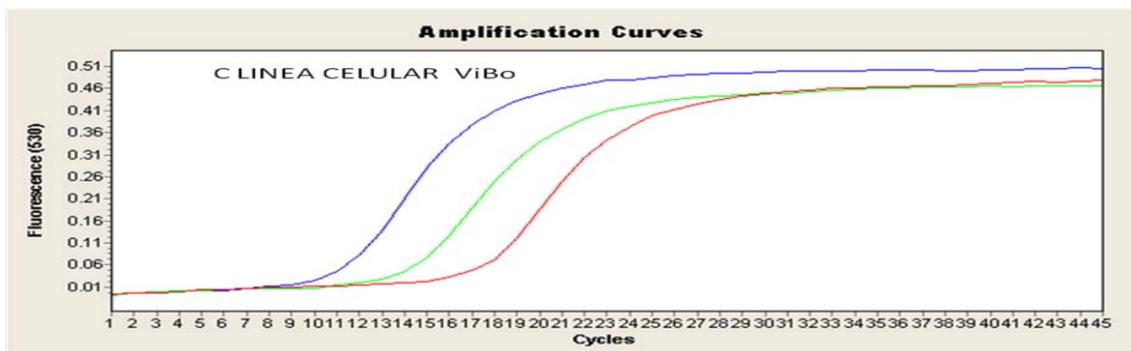
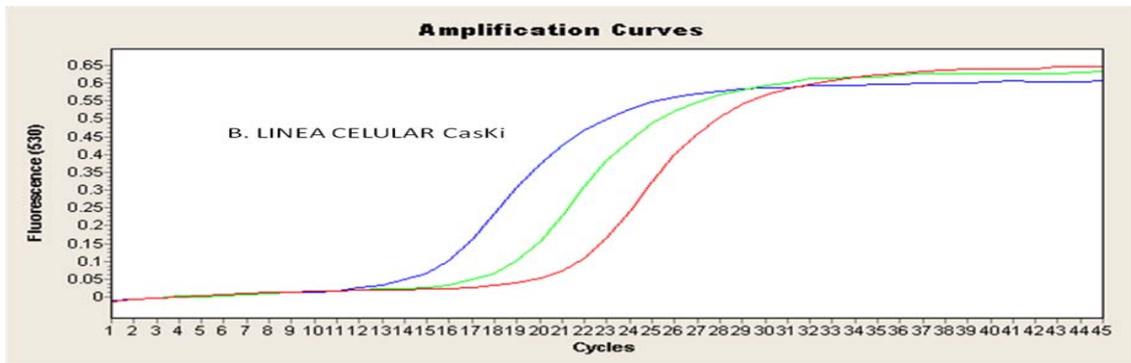
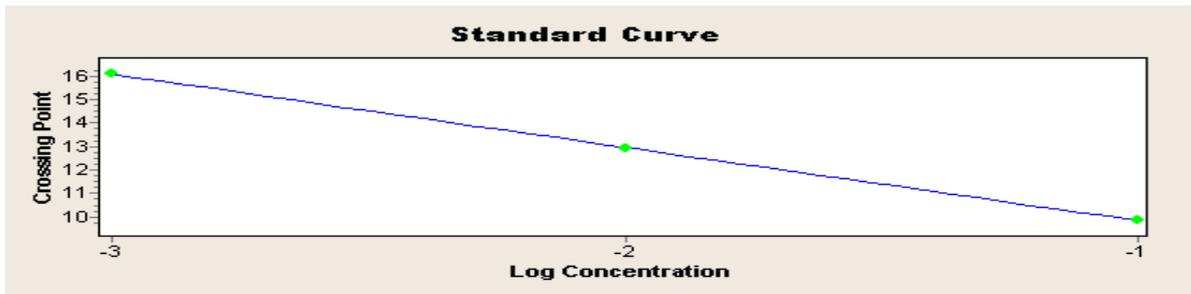
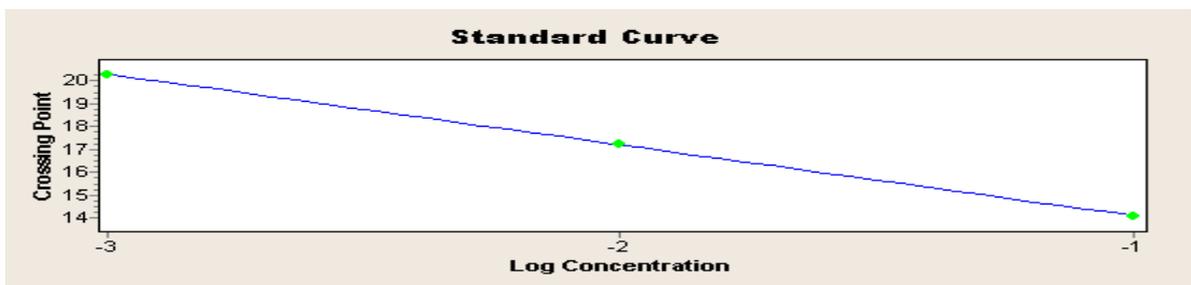


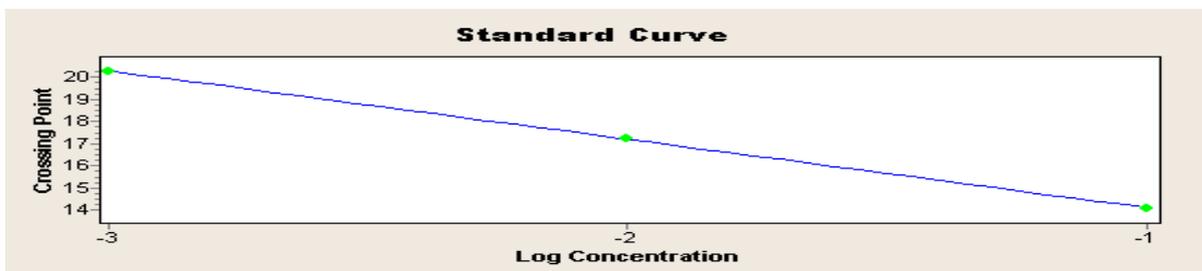
Figura 16. Curvas de rango dinámico para el gen 18s en las tres diluciones de las líneas celulares CaLo (A) CasKi (B) y ViBo (C). En las gráficas se observa el aumento de la expresión representada por la fluorescencia con respecto a los ciclos. En A, B y C la curva de color azul corresponde a la dilución 1:10, la curva color verde 1:100 y la curva color rojo 1:1000. En estas curvas se logró observar que el aumento de cada dilución se encuentra en una relación de 3 veces entre ellas. Al linearizar obtenemos las curvas estándar que se muestran en la fig. 17.



17 A. Curva estándar para el gen 18s en línea celular CaLo  
Error: 0.0225 Eficiencia: 2.114



17 B. Curva estándar para el gen 18s en líneas celular CasKi  
Error: 0.000907 Eficiencia: 2.059



17 C Curva estándar de la expresión del gen 18s en línea celular ViBo  
Error: 0.00987 Eficiencia: 2.067

Figura 17. Curva estándar de la expresión del gen 18s en la línea celular ViBo tratadas con ceramida, mostrando los logaritmos de la concentración con respecto a los cp's de cada una de las muestras, estos datos se tomaron de la curva de rango dinámico que se muestra en la figura 16.

### 8.3 .2 Curvas de rango dinámico y amplificación de los genes UGCG y MDR-1

Una vez que se obtuvo la estandarización para el gen housekeeping, se realizaron las curvas de rango dinámico y las curvas estándar para los genes UGCG y MDR-1, se utilizaron 3 diferentes concentraciones de cada una de las muestras.

En la figura 18 se observan de manera representativas de las tres líneas celulares, la curva de rango dinámico del gen UGCG de la línea celular ViBo tratada con ceramida y en la figura 19 se muestra la curva estándar en la línea celular ViBo.

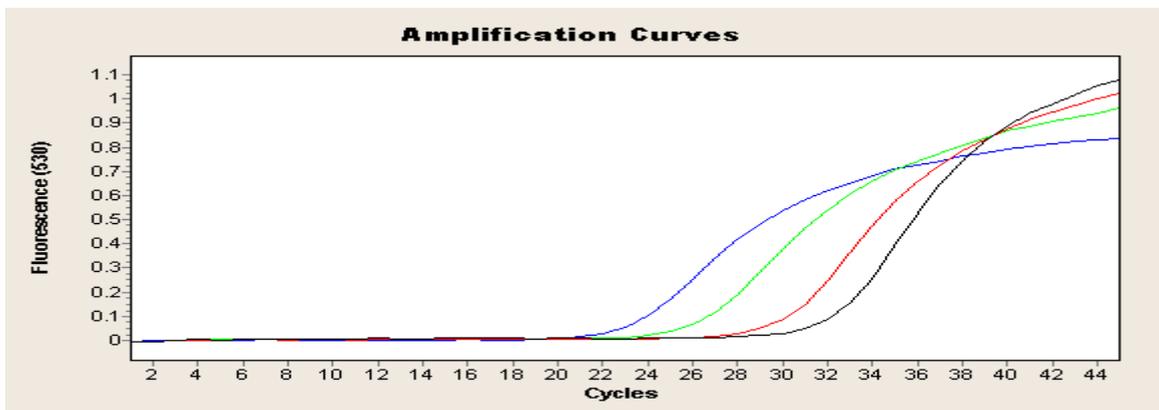
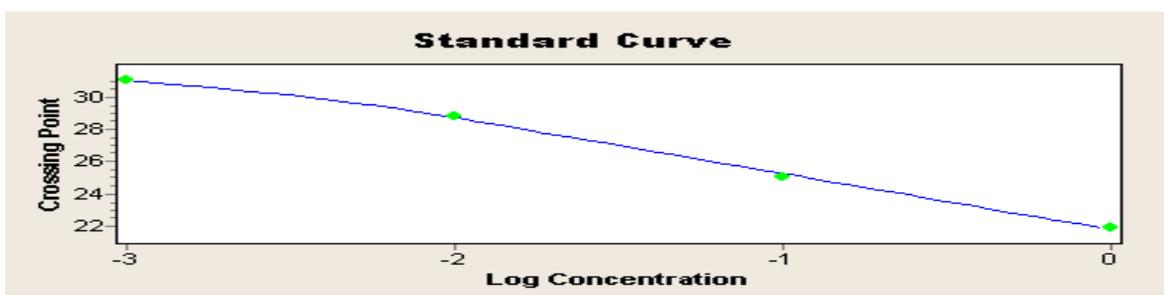


Figura 18. Curva de rango dinámico del gen UGCG de la línea celular ViBo. Se utilizó la línea celular ViBo concentrada y 3 diferentes concentraciones. La curva de color azul representa la muestra concentrada (110ng/ $\mu$ L), verde es la muestra 1:10, la de color rojo es la muestra 1:100 y la de color negro corresponde a la dilución 1:1000 de la muestra.



Error =0.00096 eficiencia = 1.998

Figura 19. Curva estándar de la expresión del gen UGCG en la línea celular ViBo tratadas con ceramida, mostrando los logaritmos de la concentración con respecto a los cp's de cada una de las muestras. Estos datos se tomaron de la curva de rango dinámico que se muestra en la figura 18.

#### **8.4 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN UGCG Y MDR-1 EN LAS TRES LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON CERAMIDA**

Una vez que se obtuvieron las curvas de rango dinámico del gen de referencia y se estandarizó la concentración a usar de las muestras, se midió la expresión génica de UGCG y MDR-1 de todas las líneas celulares. Se midió por PCR en tiempo real la expresión relativa del cDNA para los genes UGCG y MDR-1 en células tratadas y no tratadas con ceramida, y se normalizó utilizando la expresión del gen constitutivo 18s.

#### **8.5 ANÁLISIS DE VARIANZA, DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS TRES LÍNEAS CELULARES.**

Después de obtener los resultados de la expresión relativa de ambos genes, se realizó un análisis estadístico con la prueba paramétrica ANOVA con ayuda del programa SPSS versión 14 y para aceptar o rechazar la hipótesis respecto a las medias de las poblaciones; esto es, si existe diferencia significativa en las medias de la expresión de los genes MDR-1 y GCS entre las líneas celulares.

Los conjuntos de datos observados en las tres líneas celulares de muestras aleatorias simples siguen una distribución normal y se comprobó la veracidad de una de las dos hipótesis.

$H_0$ :  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$  todas las poblaciones son iguales

$H_a$ :  $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$  todas las poblaciones son diferentes

Se determinó la F de tablas con una estadística de prueba del 95% y un nivel de significancia  $p \leq 0.05$ . Se calculó el valor de F mediante el cuadrado

medio intergrupos y el cuadrado medio intragrupos, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. F calculada y F de tablas para observar si existen diferencias significativas de la expresión de los genes en las tres líneas celulares tratadas con ceramida con un intervalo de confianza del 95%, un nivel de significancia  $p \leq 0.05$ , y 3 grados de libertad para el numerador y 9 grados de libertad del denominador.

Gen	F tablas	F calculada
MDR-1	7,56	10,85
UGCG	3,23	3,46

La regla de decisión para el Análisis de Varianza es: El valor calculado es mayor al de la tabla por lo tanto, se rechaza hipótesis nula. Entonces esto quiere decir que existen diferencias significativas entre las tres líneas celulares, pero no se sabe cuáles son los grupos que presentan estas diferencias. Por esta razón se realizó la prueba de Bonferroni. La regla de decisión es: El valor de F de cada comparación deber ser mayor o igual al valor de tabla ajustado para rechazar la hipótesis nula.

El resultado de las tres F calculadas fueron: 0,847, 2,342 y 5,332. Los datos reflejan que las diferencias se encuentran entre los grupos 1, 3 y 2,3 ya que la última F es mayor que la de tablas: presentándose mayor expresión de los genes GCS y MDR-1 en líneas celulares CaLo y ViBo con respecto a la línea celular CasKi.

A partir del análisis estadístico de ANOVA se obtuvieron las gráficas mostradas en la figura 20 y 21, las cuales se construyeron tomando la expresión de las células control (sin C6) asignándoles una expresión génica relativa de 1 (no graficada), a partir de esta expresión, se calculó el número de veces que aumentó el gen en las células estimuladas con C6.

En la figura 20 se muestran los resultados de la PCR en tiempo real, para el gen UGCG de las tres líneas celulares. En estos resultados se aprecia que ViBo presentó una mayor expresión relativa 700 veces, CasKi con una expresión de 5 veces y CaLo con una expresión 40 veces más que el control (cuyo valor es 1) en las tres líneas celulares tratadas con ceramida.

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 9.1 EFECTO DE LA CERAMIDA EN LAS TRES LÍNEAS CELULARES

En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado previamente que la ceramida inhibe la proliferación de células de CaCu infectadas con el HPV-18 (Gutiérrez, IJ. 1999). Sin embargo, se desconocía si esta inhibición se presentaba en células de CaCu infectadas con HPV-16 (CasKi) y sin HPV (ViBo).

En este trabajo se estudió el efecto antiproliferativo de la ceramida en tres tipos de líneas celulares de CaCu: CasKi (HPV 16), CaLo (HPV18) y ViBo (sin HPV), las cuales fueron sometidas a distintas concentraciones de ceramida (curva –dosis respuesta). Los resultados mostraron que la ceramida inhibió la proliferación en las tres líneas celulares; sin embargo la concentración necesaria para inhibir la proliferación fue diferente, entre las 3 líneas celulares.

La línea ViBo obtuvo el 40 % de proliferación, a una concentración de 10  $\mu$ M, mayor a la obtenida por CaLo y CasKi, ya que a una concentración 2.5  $\mu$ M se observó un 60 % de proliferación. Este efecto fue similar en estudios hechos por Gutierrez et. al. (1999) donde CaLo resulta ser más sensible; sin embargo, CaLo está infectada con HPV-18 y CasKi con HPV 16. Esto sugiere que en este caso el HPV no interfiere en el efecto de la ceramida.

Se ha descrito que la ceramida es un agente tóxico en varias líneas celulares, por ejemplo: en cultivos TH-29 y HCT-116 de células humanas de cáncer de colon se investigó los efectos de las bases esfingoides y ceramidas en el crecimiento y en la muerte celular, demostrando la posible aplicación *in vivo* de ceramida en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico (Arimochi H, Morita K 2008). Con lo anterior se apoya el hecho de que la ceramida puede llegar a funcionar como tratamiento en diversos tipos de cáncer.

Con nuestros resultados podemos asegurar que en las diferentes líneas celulares de CaCu la ceramida produce un efecto antiproliferativo más marcado en la línea celular HPV16 (CasKi), lo que podría ser una opción de tratamiento para cáncer donde se haya infectado por HPV16 y en menor grado en HPV18; sin embargo, también se observa que no se puede utilizar en todos los casos la misma dosis, ya que ViBo mostró requerir una dosis mayor, demostrando que en este tipo de células cancerosas es posible que se presente un fenómeno de resistencia al tratamiento con ceramida.

## **9.2 EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES MDR-1 y UGCG EN LÍNEAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO TRATADAS CON CERAMIDA**

En diferentes estudios se ha involucrado la GCS en el fenómeno de multirresistencia a drogas. Esta enzima ha sido reportada en células tumorales resistentes a algún anticancerígeno, determinándose dos factores principales involucrados: la acumulación de GC como producto de la enzima GCS y la sobreexpresión de MDR-1 (Jennifer A and shabbitis 2003). Por lo anterior, ambos genes han sido relacionados en varios tipos de cáncer que mostraron resistencia al tratamiento con agentes quimioterapéuticos.

En líneas celulares de CaCu no existen antecedentes sobre el mecanismo de resistencia a fármacos. Se ha reportado en otros tipos de cáncer como colon, ovario, mama y en cáncer epitelial in *vitro* resistencia a algún fármaco anticancerígeno (Cabot, MC et al 2001). En estudios clínicos de pacientes con cáncer de mama y melanoma que han mostrado una respuesta pobre a la quimioterapia, se ha visto acumulada la GC, y a su vez una expresión elevada de MDR-1. Es de suma importancia investigar este fenómeno de multirresistencia a drogas en CaCu ya que no ha sido investigado con anterioridad; sería de relevancia en futuras investigaciones saber si en pacientes mexicanas se desarrolla este mecanismo como parte de la evolución tumoral en CaCu.

Después de observar que existe una diferencia en la proliferación en los tres tipos de líneas celulares de CaCu en respuesta al tratamiento con

ceramida, se estudió la expresión génica de la enzima GCS cuyo gen es el UGCG y el gen de la resistencia a múltiples drogas (MDR-1), con la finalidad de investigar si ambos genes están relacionados con estas diferencias. Los resultados de la prueba estadística de ANOVA de una vía con un intervalo de confianza del 95 % y una  $p \leq 0.05$ , mostraron que tanto ViBo como CaLo tienen una diferencia significativa, en la expresión de ambos genes con respecto a la línea celular CasKi, cuya línea presentó una menor resistencia al efecto antiproliferativo. Con esto podemos afirmar que las líneas CaLo pero sobre todo ViBo están utilizando un mecanismo de resistencia a drogas para evadir el efecto tóxico de la ceramida. Dicho mecanismo fue corroborado en este trabajo al obtener una expresión elevada de los genes UGCG y MDR-1, sugiriendo que se producen elevadas concentraciones de la enzima GCS, la cual glucosila a la ceramida para formar a la GC y así poder evadir el efecto antiproliferativo, tal como sucede con algunos anticancerígenos. ( [Zhang, X et al. 2009](#)). Se ha reportado que éstos son capaces de aumentar los niveles de ceramida cuya función es promover como segundo mensajero la apoptosis, sin embargo los niveles de la GC aumentan cuando se presenta un mecanismo de resistencia a drogas. Se propone que el mecanismo de CaLo y ViBo es utilizar la enzima para evadir el efecto antiproliferativo que ejerce la ceramida sobre las células cancerosas, así que podemos asegurar que en CaCu puede existir un mecanismo de resistencia a drogas, cuando son sometidas a tratamientos con anticancerígenos que inducen ceramida, y que esto es similar cuando las células cancerosas son tratadas con ceramida.

En otros estudios en cultivos celulares se ha intentado demostrar la relación entre ambos genes, por ejemplo: Cabot y sus colaboradores, han estudiado la relación que existe entre ambos genes sobre cultivos de cáncer de mama administrando un inhibidor de la GC como es el PDMP. En consecuencia se inhibió la expresión de MDR-1, por otra parte en líneas células KBV 200 de células de carcinoma oral resistente a vincristina, se les adicionó a distintas concentraciones de Verapamil, un inhibidor del MDR-1 y DL-PPMP inhibidor del gen de la enzima que glucosila la GC, obteniendo que a 10 micromoles/L de Verapamil se inhibió la expresión del gen GCS, pero a 15 micromol/L decreció la expresión del gen MDR-1. Por otro lado, al aumentar la dosis de DL-PPMP a

25 micromoles se inhibió la expresión tanto de GCS y MDR-1 (Yang Q. 2004). Con esto se reafirma la relación de ambos genes, e incluso, actualmente se ha demostrado que son co-supresores, es decir, se regulan mutuamente (Zhang X et al 2009). Estos trabajos apoyan que realmente existe una relación en la expresión de ambos genes y que participan en los mecanismos de resistencia al tratamiento con ceramida.

En resumen, podemos concluir que en líneas celulares CaLo y ViBo los genes MDR-1 y UGCG están teniendo un papel muy importante en la multirresistencia a drogas en líneas celulares de CaCu así como en los mecanismos de resistencia al tratamiento con ceramida y que este trabajo aporta evidencias para que se sigan realizando investigaciones sobre resistencia a fármacos en CaCu.

## 10. CONCLUSIONES

- La ceramida inhibe la proliferación de las tres líneas celulares, siendo para CasKi y CaLo con una LD50 de 2.5µM reducida alrededor de un 60%, mientras que en ViBo el efecto inhibitor fue de 15µM con 40% de proliferación.
- La mayor expresión de los genes UGCG Y MDR-1 fue en las líneas celulares CaLo y ViBo tratadas con ceramida.
- El efecto de la resistencia a la inhibición de la proliferación inducida por la ceramida en células ViBo está relacionada con la expresión de los genes presentes en la resistencia a drogas.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acladios NN, Sutton C, Mandal D, Hopkins R, Zaklama M, Kitchner H. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer*. (2002); 98 (3): 435-439.
- Andrieu-Abadie N, Levade T. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim Biophys*. (2002); 1585: 126-134.
- Arimochi H, Morita K. Desipramine Induces Apoptotic Cell Death through Nonmitochondrial and Mitochondrial Pathways in Different Types of Human Colon Carcinoma Cells, *Pharmacology*. (2008); 81 (2): 164 -172.
- Baillieri, Tindall Cox, London. Carter HE, Glick FJ, Norris WP y Phillips GE. Biochemistry of sphingolipids III. Structure of sphingosine *J Biol Chem*. (1947); 170: 285-294.
- Birbes H, El Bawab S, Obeid L.M y Hannun YA. Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Advan Enzyme Regul*. (2002); 42: 113-129.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz NC, Meijer JLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* (2002); 55: 244-65.
- Bourbon NA, Yun J y Kester M. Ceramide directly activates protein kinase C. to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J Biol Chem*. (2000); 275: 35617-35623.
- Cazzolli R, Carpenter L, Biden TJ y Schmitz-Peiffer C. A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Cz, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* (2001); 50: 2210-2218.
- Chalfant CE y Spiegel S. Sphing osine 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci*. (2005); 118: 4605-4912.
- Chatterjee S y Pandey A. The Ying and Yang of lactosyl ceramide metabolism. *Biochim Biophys. Acta*. (2008); 1780: 370-38.
- Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylos C, et al. Sexual behaviour and smoking as determinats of cervical HI infection and of CIN3 among tose infected: a case-control study nested within the Machester cohort. *Br J Cancer*. (2000); 83 (11): 1565-72.
- Dahm F, Bielawska A, Nocito A, Georgiev P, Szulc Z M Bielawski J, Jochum W, Dindo D, Hannun YA, Clavien PA. Mitochondrially targeted

ceramide LCL-30 inhibits colorectal cancer in mice. *Bj cancer*. (2008); 98 (1): 98-105.

- Diagnostico y tratamiento de CaCu. Comisión nacional de cáncer cervico uterino ministerio de salud. (2003). Disponible en [http://ncd.bvsalud.org/lildbi/docsonline/4/5/054-Chile\\_Cacu.pdf](http://ncd.bvsalud.org/lildbi/docsonline/4/5/054-Chile_Cacu.pdf). Acceso 23 de septiembre 2009.
- Dickson RC. Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res*. (2008); 64 (17): 909-921.
- Dumitru CA, Zhang Y, Li X y Gulbins E. Generation of ceramide in the plasma membrane, with the subsequent formation of large ceramide-enriched membrane platforms, serves signal transduction via receptors, but also nonreceptor-mediated activation of cells. *Antioxidants & Redox Signaling* (2007); 9: 1535-1540.
- Efectos secundarios de quimioterapia. Sociedad española de oncología médica 2008. Disponible en <http://www.seom.org/infopublico/guia-actualizada/efectos-secundarios-de-la-quimioterapia>. Acceso 26 de agosto de 2009.
- Furuya S, Mitoma J, Makino A, Hirabayashi Y. Ceramide and its interconvertible metabolite sphingosine function as indispensable lipid factors involved in survival and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J. Neurochem*. (1998); 7: 366-77.
- Futerman AH, Rietzman H. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol*. (2005); 15: 312-31.
- Gouazé-Andersson V, Kreitenberg AJ, Bielawska A, Giuliano AE and Cabot MC. Ceramide and glucosylceramide upregulate expression of the multidrug resistance gene MDR-1 in cancer cells. *Biochim Biophys*. (2007); 1771: 1407-1417.
- Gutiérrez, IG. (1999). Efecto de la ceramida en la proliferación de células tumorales provenientes de cérvix humano. Tesis de Licenciatura.
- México. UNAM FES-Zaragoza.
- Hajduch E, Turban S, Le Liepvre X, Le Lay S, Lipina C, Dimopoulos N, Dugail and Hundal HS. Targeting of PKC and PKB to caveolin enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signaling by ceramide *Biochem. J*. (2008); 410: 369-379.
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M y Nishijima M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* (2003); 426: 803-809.271.

- Hannun YA and Lina MO. The Ceramide-centric Universe of Lipid-mediated Cell Regulation: Stress Encounters of the Lipid Kind. *The Journal of biological chemistry*. (2002); 25847-25850.
- Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchicov V, Winoto-Morbach S, Vickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A y Schütz S. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell death Differ* (2004); 11: 550-563.
- Herget T, Esdar C, Oehrlein SA, Heinrich M, Schutze S, Maelicke A, van Echeten-Deckert G. Production of ceramides causes apoptosis during early neural differentiation in vitro. *J Biol Chem*. (2000); 275: 30344-54.
- Hervé LS, Courtney P, Hong L, Sheldon M. and Sarah S. Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochimica et Biophysica (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*. (2002); 8-17.
- IARC screening grup. Introducción a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC). 2009. Disponible en <http://screening.iarc.fr/colpoforeword.php?lang=3>. Acceso 22 de septiembre 2009.
- Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepitelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J*. (2002); 78: 225-228.
- Jennifer A and Shabbitis. Therapeutic applications of ceramide lipids for apoptosis induction Trabajo para obtener el título en ciencias farmarmaceuticas 2003. University of Britich
- Karp G. *Biología celular y molecular conceptos y experimentos 4ed*. México Mc-Graw Hill, México 2006 1250-1230.
- Kok JW, Veldman RJ, Klappe K..Differential expression of sphingolipids in MRP1 overexpressing HT29 cells. *Int J Cancer*. (2000); 87: 172–178.
- Laviad EL, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merrill AH Jr, Futerman AH. Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity and inhibition by sphingosine 1- phosphate. *J Biol Chem* (2008); 283 (9): 5677-5694.
- Le Stunff H, Giussani P, Maceyka M, Lepine S, Milstien S and Spiegel. Recyclin of Sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohidrolase and sphingosine kinase II. *J Biol Chem*. (2007); 47, 34372-34380.
- Links D. TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and-3 activation. *Cell death Differ* (2000); 11: 550-563.

- Liu YY, Han TY, Giuliano AE, and Cabot MC. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J.* (2001); 15 (7): 19-730.
- Malisan F. GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys.* (2002); 1585: 179-187.
- Marchesini N, Hannun YA. Acid. and neutral sphingomyelinases: roles and mechanism of regulation. *Biochem Cell Biol.* (2004); 82: 27-44.
- Massiello A, Salas A, Pinkerman R. L, Roddy P, Roesser J. R, and Chalfant Ch. E. Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide. *J Biol Chem.* (2004); 279 (16): 114-116.
- Medler T, Petrusca DN, Lee PJ, Hubbard WC, Berdyshev EV, Skirball J, Kamocki K, Schuchman R, Tudor RM y Petrache I. Apoptotic Sphingolipid Signaling by Ceramides in Lung Endothelial Cells. *American J. Respiratory Cell and Mol Biol.* (2008); 38: 639-646.
- Merrill AH. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem.* (2002); 277: 25843-25846.
- Mitsuru I, et al. Possible role of ceramide as an indicator of chemoresistance decrease of the ceramide content via activation of Glucosylceramide synthase and sphingomyelin synthase in chemoresistant leukemia. *Clinical Cancer Research.* (2003); 415-423.
- Mohar BA, GA, et al. Epidemiología descriptiva del cáncer cérvico uterino. *Rev Inst. Nacional de Cancerología.* (1993); 39: 1849-54.
- Morales A, Lee H, Goñi FM, Kolesnick R. y Fernández-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* (2007); 12: 923-939.
- Nieto FL, Pescio LG, Favale NO, Adamo MA y Sterin-Speziale NB. Sphingolipid metabolism is a crucial determinant of cellular fate in non stimulated proliferating Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells *JBC* (2008); 283: 25682-25691.
- Ogretmen B. Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Letters* (2006); 580: 5467-5476.
- Palacios E. Función de los esfingolípidos en la señalización celular. *An R Acad.* (2008); 235 -238.
- Palacios E, Miró MJ y Carrizosa MC. Ceramida y apoptosis. *An. R. Acad,* (2004); 119-142.
- Palma L. Epidemiología del virus del papiloma humano. *Medicina familiar* (2006); 62-80.

- Perry RJ y Ridgway ND. Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol Biol Cell* (2006); 17: 2604-2616.
- Pfister H. In Lorincz AT, Reid. R, The role of human papilloma virus in anogenital cancer editors. *Human Papillomavirus. Obstet Gynecol Clin NA.* (1996); 23: 579-595.
- Pruett SH, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, Liota DN y Merrill AH Jr. Biodiversity of sphingoid bases («sphingosines») and related alcohols *J Lipid* (2008); 4; 1621-1639.
- Radin NS, Killing. Cancer cells by poly-drug elevation of ceramide levels. A hypothesis whose time has come. *Eur J Biochem.* (2001); 26: 193–204.
- Reynolds CP, Maurera BJ, Richard NK. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy *el sevie.* (2004); 256-267
- Allegood JC, Wang E, Merrill AH y Futerman JR. Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, LASS4 and LASS5, regulate dihydroceramide síntesis using different fatty acyl-CoA donors. *J Biol Chem.* (2003); 278: 43452-43459.
- Ruckhäberle E, Kam T, Hanker L, Gätje R, Metzler D, Holtrich U, Kaufmann M y Rody A. Prognostic relevance of glucosylceramide synthase (GCS) expression in breast cancer *J Cancer Res. Clin Oncology.* (2008); 134 (1): 1-10.
- Ruiz M J, Souvion R. A, Martínez MM. La glicoproteína-P una canal de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer; *Anales de Medicina Interna.* (2002); 485-406.
- Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological Research* (2003); 47; 383-392.
- Sedjo RL, Roe DJ, Abrahamsen M, Harris RB, Craft N, Baldwin S, et al. Vitamin A, carotenoids and risk of persistent oncogenic human papilloma infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2002); 11:876-84.
- Ségui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrézou JP, Benoist H y Levade T Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochem Biophys. Acta* (2006); 1758: 2104-2120.
- Senchenkov A, David A, Litvak, Myles C. Cabot. Targeting Ceramide Metabolism Strategy for Overcoming Drug Resistance. *Journal of the national cancer institute.* (2001); 347-355.

- Shannon J, Thomas DB, Ray RM, Kestin M, Koetsawang A, Chitnarong K, et al.. Dietary risk factors for invasive and in situ cervical carcinoma in Bangkok, Thailand. *Cáncer Causes Control*. (2002); 691-9.
- Tapia RC, Sandoval RJ, García M, Durán DA, Cáncer cérvicouterino. Factores de riesgo y alteraciones asociadas en mujeres del estado de Guerrero. *Rev Inst Nal Cancerol*; (1998); 44: 19-27.
- Tepper AD, Ruurs P, Wiedmer T, Sims PJ, Borst J y van Blitterswijk WJ. Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J Cell Biol*. (2000); 150: 155-164.
- The oral cancer foundation. Radioterapia. 2009 <http://WWW.oralcancerfundation.org/org/facts/radioterapia.htm>. Acceso 30 julio 2010.
- Thudichum JLW (1884). A treatise on the chemical constitution of brain.
- Van Blitterswijk WJ, Van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M y Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics *Biochem*. (2003); J. 369: 199-211.
- Van Helvoort A. Transport of sphingomyelin to the cell surface is inhibited by brefeldin and in mitosis, where C6-NBD-sphingomyelin is translocated across the plasma membrane by a multidrug transporter activity. *J Cell Sci*. (1997); 110: 75-98.
- Virus del papiloma humano (HPV) cáncer. Características y tipos de papiloma virus humano. Disponible en <http://www.hpv.cancer.com/2007/11/caractersticas-y-tipos-de-papilomavirus.html> 2009. Acceso 25 de septiembre 2009.
- Wayne MB, Lewis JK, Hardin J. El mundo de la célula. 7ed. Ed. Person educación S.A. Madrid, 2007; 833-846.
- Wikipedia la enciclopedia libre. Inmunoterapia. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Inmunoterapia>. 2010. Acceso 21 de agosto 2010.
- World Health Report (2004). Geneva, World Health Organization.
- Xie H, Johnson GV. Ceramide selectively decreases tau levels in differentiated PC12 cells through modulation of calpain *J.Neurochem*. (1997); 69: 1020-30.
- Yi F Zhang AY Janscha JL Li PL Zou AP. Homocysteine activates NADH/NADPH oxidase through ceramide-stimulated Rac GTPase activity in rat mesangial cells. *Kidney Int*. (2004); 66: 1977-1987.

- Zeidan y H, Hannun A. Translational aspects of sphingolipid metabolism. *Trends in Molecular Medicine* (2007); 13: 327- 336.
- Zhang X, Li J, Qiu Z, Gao P, Wu X, Zhou. Co-suppression of MDR-1 (multidrug resistance 1) and GCS (glucosylceramide synthase) restores sensitivity to multidrug resistance breast cancer cells by RNA interference (RNAi). *Cancer therapy and biology* (2009); 54: 1117-21.
- Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelli S, Allegood JC, Liu Y, Peng O, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M y Merrill AH Jr. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signalling and autophagy. *Biochim Biophys.* (2006); 1758: 1864-1884.
- Zhou Xu JZ, McCoy DM y Mallampalli RK. LASS5 is the predominant ceramide synthase isoform involved in the novo sphingolipid synthesis in lung epithelia. *J Lipid Res.* (2005); 46: 1229-1238.