

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE COLINA  
QUINASA EN CÁNCER DE MAMA.**

TESIS DOCTORAL  
NÉSTOR ÁLVAREZ AYERZA  
Madrid, 2013



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Mecanismo de acción de los inhibidores de colina quinasa en  
cáncer de mama.**

Memoria que presenta **D. Néstor Álvarez Ayerza,**

Licenciado en Bioquímica, para optar al grado de Doctor

Directores de la Tesis:

**Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán**

Profesor de Investigación de Organismos Públicos de Investigación (OPIs)

**Dra. M<sup>a</sup> Teresa Gómez del Pulgar Garrote**

Investigadora Sénior

Centro Nacional de Biotecnología, Darwin 4, 28049 Madrid

e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM

C/Arturo Duperier 4, 28029 Madrid





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE MADRID



CONSEJO SUPERIOR

DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

El **Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán**, Profesor de Investigación de Organismos Públicos de Investigación y la **Dra. M<sup>a</sup> Teresa Gómez del Pulgar Garrote**, Investigadora Sénior del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas certifican que

**D. Néstor Álvarez Ayerza**, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), ha realizado su Tesis Doctoral titulada **“Mecanismo de acción de los inhibidores de colina quinasa en cáncer de mama”**, bajo nuestra dirección, en el Centro Nacional de Biotecnología y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad Autónoma de Madrid.

Consideramos que la presente Tesis Doctoral reúne a nuestro juicio las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por lo tanto, se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor.

Para que así conste, firmamos la presente autorización para la defensa de esta Tesis en Madrid a 5 de noviembre de dos mil trece.

Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Gómez del Pulgar Garrote

Director

Codirectora

Profesor de Investigación de Organismos  
Públicos de Investigación

Investigadora Sénior  
Centro Nacional de Investigaciones  
Oncológicas

Dra. Isabel Correas Hornero,

Tutora de la Tesis,

Catedrática del Departamento de Biología Molecular

Universidad Autónoma de Madrid



El presente trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, pertenecientes al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid. Ha sido dirigido por el Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuán (Profesor de Investigación de Organismos Públicos de Investigación) y la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Gómez del Pulgar Garrote (Investigadora Senior del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) con la Tutoría de la Dra. Isabel Correas Hornero (Catedrática del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid).

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca FPI, concedida a Néstor Álvarez Ayerza por el Ministerio de Educación y Ciencia e Innovación en el año 2009.





**A mi padre**



**A mi madre**



*“Quien no haya experimentado  
la irresistible atracción de la ciencia,  
no podrá comprender su tiranía”*

Frankenstein.

Mary Shelley



*“Si cierras el puño, tu mano  
siempre estará vacía”*

Chow Yun Fat

Tigre y Dragón





***ÍNDICE***

---



---



---

**ÍNDICE**

|                 |                                                                                                                       |                  |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b><u>1</u></b> | <b><u>ABREVIATURAS</u></b>                                                                                            | <b><u>3</u></b>  |
| <b><u>2</u></b> | <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>                                                                                            | <b><u>11</u></b> |
| 2.1             | <i>El cáncer.....</i>                                                                                                 | <i>11</i>        |
| 2.2             | <i>El cáncer de mama.....</i>                                                                                         | <i>13</i>        |
| 2.3             | <i>El ciclo de Kennedy: de colina a fosfatidilcolina .....</i>                                                        | <i>17</i>        |
| 2.4             | <i>Colina quinasa y su papel en la tumorigénesis.....</i>                                                             | <i>18</i>        |
| 2.5             | <i>Colina quinasa y cáncer de mama .....</i>                                                                          | <i>22</i>        |
| 2.6             | <i>Esfingolípidos: ceramidas y su metabolismo .....</i>                                                               | <i>22</i>        |
| 2.7             | <i>Papel de las ceramidas en cáncer.....</i>                                                                          | <i>26</i>        |
| 2.8             | <i>Papel de esfingosina-1-fosfato y ceramida-1-fosfato en cáncer.....</i>                                             | <i>29</i>        |
| <b><u>3</u></b> | <b><u>OBJETIVOS</u></b>                                                                                               | <b><u>33</u></b> |
| <b><u>4</u></b> | <b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>                                                                                    | <b><u>37</u></b> |
| 4.1             | <i>Fármacos e inhibidores enzimáticos.....</i>                                                                        | <i>37</i>        |
| 4.2             | <i>Cultivos celulares .....</i>                                                                                       | <i>37</i>        |
| 4.3             | <i>Análisis de viabilidad celular.....</i>                                                                            | <i>39</i>        |
| 4.4             | <i>Determinación de los parámetros IC<sub>50</sub>, GI<sub>50</sub>, TGI, LC<sub>50</sub> .....</i>                   | <i>39</i>        |
| 4.5             | <i>Ensayos de citometría de flujo.....</i>                                                                            | <i>40</i>        |
| 4.6             | <i>Extracción de proteína total procedente de líneas celulares.....</i>                                               | <i>41</i>        |
| 4.7             | <i>Separación electroforética de proteínas procedentes de líneas celulares e inmunodetección (Western Blot) .....</i> | <i>41</i>        |
| 4.8             | <i>Extracción de ARN total procedente de líneas celulares y PCR cuantitativa.....</i>                                 | <i>43</i>        |
| 4.9             | <i>Análisis de esfingolípidos .....</i>                                                                               | <i>43</i>        |
| 4.10            | <i>Análisis de fosfolípidos.....</i>                                                                                  | <i>44</i>        |

# Índice

---

---

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.11 Estudios de resonancia magnética nuclear .....                                                            | 45 |
| 4.12 Marcaje específico de SM mediante la unión de lisenina.....                                               | 46 |
| 4.13 Análisis de especies reactivas de oxígeno por microscopía in vivo.....                                    | 47 |
| 4.14 Estudio de la localización intracelular del factor inductor de apoptosis<br>por microscopía confocal..... | 47 |
| 4.15 Ensayo de actividad de las caspasas 3/7.....                                                              | 48 |
| 4.16 Análisis estadístico.....                                                                                 | 48 |

---

---

## 5

## **BIBLIOGRAFÍA**

**53**

## ***ABREVIATURAS***

---



## 1 Abreviaturas

|                         |                                                                                                                     |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\Delta\Delta\text{Ct}$ | delta delta Ct                                                                                                      |
| 5FU                     | 5 fluorouracilo                                                                                                     |
| aCDasa                  | Ceramidasa ácida                                                                                                    |
| AIF                     | Factor de inducción de apoptosis ( <i><u>A</u>ppoptosis <u>I</u>nducing <u>F</u>actor</i> )                         |
| AJCC                    | Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer ( <i><u>A</u>merican <u>J</u>oint <u>C</u>ommittee of <u>C</u>ancer</i> ) |
| alCDasa                 | Ceramidasa alcalina                                                                                                 |
| AMPK                    | Quinasa activada por AMP ( <i><u>A</u>MP activated protein <u>K</u>inase</i> )                                      |
| aSMasa                  | Esfingomielinasa ácida                                                                                              |
| ATCC                    | Colección Americana de Cultivos Celulares ( <i><u>A</u>merican <u>T</u>ype <u>C</u>ulture <u>C</u>ollection</i> )   |
| CDP-colina              | Citidina difosfocolina                                                                                              |
| CDasa                   | Ceramidasa                                                                                                          |
| Cer                     | Ceramida                                                                                                            |
| Cer-1P                  | Ceramida-1-fosfato                                                                                                  |
| CerS                    | Ceramida sintasa                                                                                                    |
| CERT                    | Proteína transportadora de ceramidas ( <i><u>C</u>eramide <u>t</u>ransfer protein</i> )                             |
| Cho                     | Colina ( <i><u>C</u>holine</i> )                                                                                    |
| ChoK                    | Colina quinasa ( <i><u>C</u>holine <u>K</u>inase</i> )                                                              |
| CT                      | Citidiltransferasa                                                                                                  |
| CTP                     | Citidina trifosfato                                                                                                 |
| CMP                     | Citidina monofosfato                                                                                                |
| DAG                     | Diacilglicerol                                                                                                      |

# Abreviaturas

---

|                  |                                                                                                       |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DCF              | Diclorofluoresceína                                                                                   |
| Des              | Desipramina                                                                                           |
| DEGS             | Dihidroceramida desaturasa                                                                            |
| DH-Cer           | Dihidroceramida                                                                                       |
| DMAPP            | D-erythro-MAPP                                                                                        |
| DMEM             | Medio <i>Eagle</i> Modificado por Dulbecco                                                            |
| DMEM F-12        | Medio <i>Eagle</i> Modificado por Dulbecco, Ham's F12 en proporción 1:1                               |
| EGFR             | Receptor del factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )             |
| ER               | Receptor de estrógenos                                                                                |
| ERK              | Quinasa regulada por señales extracelulares ( <i>Extracellular Signal Regulated Kinases</i> )         |
| ESI-MS/MS        | Espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray                                     |
| ETK              | Etanolamina quinasa                                                                                   |
| EtOH             | Etanol                                                                                                |
| FB1              | Fumonisina B1                                                                                         |
| FPLC             | Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas ( <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> ) |
| GalCer           | Galactosilceramida                                                                                    |
| GluCer           | Glucosilceramida                                                                                      |
| GI <sub>50</sub> | Concentración de inhibición del 50% del crecimiento                                                   |
| GPC              | Glicerofosfolina                                                                                      |
| GW               | GW4869                                                                                                |
| HC-3             | Hemicolinio-3                                                                                         |



|                  |                                                                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HER2             | Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 ( <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> ) |
| HMEC             | Células primarias humanas de mama ( <i>Human mammary epithelial cells</i> )                         |
| HPLC             | Cromatografía líquida de alta presión ( <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )             |
| IC <sub>50</sub> | Concentración de inhibición 50                                                                      |
| ICGC             | Consortio Internacional del Genoma del Cáncer ( <i>International Cancer Genome Consortium</i> )     |
| IP               | Ioduro de propidio                                                                                  |
| LC <sub>50</sub> | Concentración letal 50                                                                              |
| JNK              | c-jun N-terminal quinasa ( <i>c-Jun N-terminal Kinase</i> )                                         |
| KSR              | Quinasa supresora de RAS ( <i>Kinase Suppressor of RAS</i> )                                        |
| LPA              | Ácido lisofosfatídico ( <i>Lysophosphatidic acid</i> )                                              |
| MAPKs            | Proteínas quinasas activadas por mitógeno ( <i>Mitogen-activated protein kinases</i> )              |
| MetOH            | Metanol                                                                                             |
| MN               | MN58b                                                                                               |
| MN-R             | MN58b-R                                                                                             |
| MTT              | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio                                         |
| Myr              | Miriocina                                                                                           |
| MSA              | Ácido metasulfónico ( <i>Methanesulfonic acid</i> )                                                 |
| nCDasa           | Ceramidasa neutra                                                                                   |
| NCS              | Suero de ternera neonata ( <i>Newborn Calf Serum</i> )                                              |
| nSMasa           | Esfingomielinasa neutra                                                                             |
| OMS              | Organización Mundial de la Salud                                                                    |

# Abreviaturas

---

|             |                                                                                                     |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PA          | Ácido fosfatídico ( <i>Phosphatidic acid</i> )                                                      |
| PC          | Fosfatidilcolina ( <i>Phosphatidylcholine</i> )                                                     |
| PCho        | Fosfocolina ( <i>Phosphocholine</i> )                                                               |
| PE          | Fosfatidiletanolamina ( <i>Phosphatidylethanolamine</i> )                                           |
| PEMT        | Fosfatidiletanolamina metiltransferasa                                                              |
| PEtn        | Fosfoetanolamina ( <i>Phosphoethanolamine</i> )                                                     |
| PHOSPHO1    | Fosfocolina/fosfoetanolamina fosfatasa<br>( <i>Phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase</i> ) |
| PISD        | Fosfatidilserina decarboxilasa ( <i>Phosphatidylserine Decarboxylase</i> )                          |
| PKC $\zeta$ | Proteína quinasa C $\zeta$                                                                          |
| PLD         | Fosfolipasa D                                                                                       |
| PP1         | Proteína fosfatasa 1                                                                                |
| PP2A        | Proteína fosfatasa 2 A                                                                              |
| PR          | Receptor de progesterona                                                                            |
| PS          | Fosfatidilserina ( <i>Phosphatidylserine</i> )                                                      |
| Rb          | Proteína del retinoblastoma                                                                         |
| RMN         | Resonancia magnética nuclear                                                                        |
| ROS         | Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )                                    |
| RPMI1640    | Instituto Memorial Roswell Park ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )                          |
| RQ          | Cuantificación relativa ( <i>Relative Quantification</i> )                                          |
| RSM         | RSM932A                                                                                             |
| RSM-R       | RSM932A-R                                                                                           |
| S1P         | Esfingosina-1-fosfato                                                                               |
| Sa          | Esfinganina                                                                                         |

|       |                                                                                     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| SaP   | Esfinganina-1-fosfato                                                               |
| SM    | Esfingomielina                                                                      |
| So    | Esfingosina                                                                         |
| SPT   | Serina palmitoil transferasa                                                        |
| ST    | Stock                                                                               |
| TLC   | Cromatografía en capa fina ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )                     |
| TGI   | Inhibición total del crecimiento                                                    |
| TXNIP | Proteína de interacción con tiorredoxina ( <i>Thioredoxin Interacting Protein</i> ) |



# ***INTRODUCCIÓN***

---



## 2 Introducción

### 2.1 El cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial con especial incidencia en los países desarrollados. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2008 se diagnosticaron 12,66 millones de nuevos casos de cáncer y 7,56 millones de personas fallecieron a causa de esta enfermedad en todo el mundo. En España, el 28,1% de los fallecimientos en 2010 fueron causados por algún tipo de cáncer, siendo la primera causa de muerte en varones y la segunda en mujeres (Instituto Nacional de Estadística, 2010).

El cáncer se caracteriza por el desarrollo oportunista de células anormales, que se dividen y crecen sin control en cualquier parte del cuerpo. Este crecimiento sin control se puede producir por numerosas causas entre las que destacan el aumento de la proliferación celular o la inhibición de la muerte celular. Bajo la designación de cáncer se engloban más de 200 patologías entre las cuales los cinco tipos más frecuentes a nivel mundial son los de cáncer de pulmón, mama, colorrectal, estómago y próstata (Globocan, 2008).

Una parte de los tumores que se originan a lo largo de la vida derivan en cánceres formados por células que se han convertido en malignas por acumulación de mutaciones y alteraciones cromosómicas en su genoma, obteniendo una ventaja adaptativa sobre las células normales. Estas alteraciones pueden estar causadas por agentes externos (radiaciones, productos químicos), agentes infecciosos (virus del papiloma humano, *Helicobacter pylori*, *Aspergillus*) o fallos en la replicación del ADN durante la división celular. Estas alteraciones se desarrollan normalmente durante el transcurso de 20 – 30 años.

El mecanismo por el que las células se hacen cancerosas es el objetivo de multitud de estudios. Hanahan y Weinberg, resumen de forma generalmente aceptada en “*The hallmarks of cancer*” (Hanahan y Weinberg, 2000, Hanahan y Weinberg, 2011), las 8 capacidades que han de adquirir las células en el proceso de la formación de un cáncer:

1. Mantenimiento de las señales proliferativas.
2. Inmortalidad replicativa, impidiendo la senescencia y la muerte celular.

# Introducción

---

3. Bloqueo de la señalización antiproliferativa, inhibiendo genes antitumorales.
4. Resistencia a la muerte celular programada o apoptosis.
5. Inducción de angiogénesis, manteniendo los requisitos energéticos del tumor.
6. Activación de la invasión y metástasis.
7. Reprogramación del metabolismo energético.
8. Evasión de la respuesta inmune.

Estas ocho capacidades permiten a las células cancerígenas sobrevivir, proliferar y diseminarse, y son adquiridas de maneras muy diferentes, y en orden muy diverso, pero en todos los casos se necesita que ocurran dos características: inestabilidad genética, generando mutaciones aleatorias en las células tumorales, e inducción de procesos inflamatorios, promoviendo el desarrollo de tumores.

Recientemente Vogelstein y su grupo analizan y resumen los resultados generados tras la secuenciación del genoma de multitud de tumores (Vogelstein *et al.*, 2013) concluyendo que se han identificado 140 genes conductores de tumores (*drivers*), algunos tienen mutaciones genéticas que confieren una ventaja sobre el crecimiento celular, otros lo son por mecanismos epigenéticos y su estudio es más complejo pues es más difícil su identificación debido a la falta de mutaciones. Los genes conductores se agrupan en 12 cascadas de señalización, involucrados a su vez en 3 procesos celulares: diferenciación/itinerario/destino celular, supervivencia celular y mantenimiento del genoma. Existe una heterogeneidad intra- e intertumoral, que dificulta la respuesta terapéutica. Esta heterogeneidad afecta a las mutaciones genómicas pero no a las cascadas de señalización alteradas.

Por tanto, el cáncer es un conjunto de patologías heterogéneas y dinámicas que evolucionan y se adaptan al entorno, explicando así la dificultad de su tratamiento. Por ello es necesario el estudio de todas estas capacidades y características para con un mayor conocimiento de éstas, poder desarrollar métodos de detección precoz y nuevos fármacos enfocados a terapias personalizadas y dirigidas frente a dianas específicas que permitan curar o aumentar la esperanza de vida de los pacientes.



## 2.2 El cáncer de mama

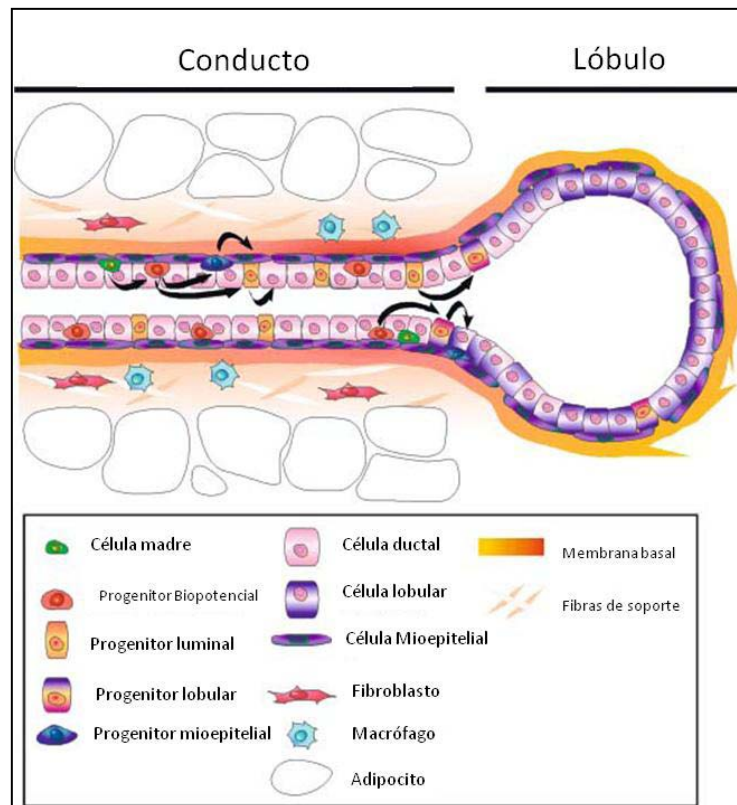
El cáncer de mama es el más común en el mundo entre las mujeres, y es prácticamente exclusivo de este sexo, pues menos del uno por ciento de los pacientes con cáncer de mama son varones (Fentiman *et al.*, 2006).

En 2010, el cáncer de mama fue la causa de 458.000 defunciones en el mundo. La incidencia es muy variable, siendo muy baja (menos de 20 casos por 100.000 habitantes) en África subsahariana, China y otros países del este asiático (excepto Japón), o alta (80-90 casos por 100.000 habitantes) en países de Norte América, América del sur, Australia y países de Europa occidental (Globocan, 2008). El riesgo de padecer cáncer de mama se incrementa con la acumulación de los ciclos ováricos (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002). La supervivencia al cáncer de mama se acerca al 85% en países desarrollados y en torno al 50-60% en países en vías de desarrollo (Globocan, 2008).

La glándula mamaria está compuesta por diferentes tipos celulares. Morfológicamente presenta una red de conductos que acaban en un lóbulo. Los conductos están formados por dos capas de células: luminal y mioepitelial (Almendro y Fuster, 2011). Los lóbulos contienen células mioepiteliales envolviendo a las células lobulares (Figura 1).

Hay dos posibles teorías para la aparición del cáncer de mama. Una propone a las células madre de la glándula mamaria como la clave en la carcinogénesis, dada su larga vida y su posibilidad de acumular mutaciones, por lo que todos los tipos de cáncer de mama provendrían del mismo tipo celular (Almendro y Fuster, 2011). La segunda teoría, propondría a cada tipo celular de la glándula mamaria como responsable del origen de los diferentes subtipos de cáncer de mama (Polyak, 2007).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que incluye varios tipos de tumores con características histológicas y moleculares diversas, resultando en un comportamiento clínico diferente (Vargo-Gogola y Rosen, 2007, Weigelt *et al.*, 2010a). La OMS ha descrito hasta 18 subtipos histológicos de cáncer de mama (Globocan, 2008), de estos los mayoritarios son el carcinoma ductal invasivo (50-80% de los casos) y el carcinoma lobulillar invasivo (5-15% de los casos), los 16 subtipos restantes son minoritarios (Weigelt *et al.*, 2010b).



**Figura 1. Esquema de la unidad básica de la glándula mamaria.** La glándula mamaria está compuesta por una lámina de células, ductal o lobular, rodeada por una capa de células mioepiteliales. Diferentes progenitores dan lugar a las diferentes células ductales, lobulares o mioepiteliales (Almendro y Fuster, 2011).

Molecularmente, el cáncer de mama se puede clasificar en: luminal A, luminal B (Perou *et al.*, 2000), basal (también conocido como triple negativo), Her2+ y normal (“*normal like*”) (Parker *et al.*, 2009). Además de esta clasificación, en los últimos años se han descrito 3 subtipos moleculares más (Weigelt *et al.*, 2010b): apocrino molecular, interferón y “*Claudin-low*”, los tumores de este último subtipo tienen un patrón genómico parecido a las células madre cancerígenas. En la Tabla 1 se resumen los rasgos característicos de los principales subtipos moleculares de cáncer de mama.

| Subtipo molecular | Frecuencia | Niveles de ER, Her2 y PR         | Otros marcadores                   |
|-------------------|------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Basal             | 10-20%     | ER-<br>PR-<br>Her2-              | Citoqueratinas 5 , 6 y 17<br>EGFR+ |
| Her2+             | 10-15%     | ER-<br>PR-<br>Her2+              |                                    |
| "Normal-Like"     | 5-10%      | ER-/+<br>PR desconocido<br>Her2- | Citoqueratinas 5 y 6<br>EGFR+      |
| Luminal A         | 50-60%     | ER+<br>PR+<br>Her2-              | Citoqueratinas 8 y 18              |
| Luminal B         | 10-20%     | ER+/-<br>PR+/-<br>Her2-/+        | Citoqueratinas 8 y 18              |

**Tabla 1. Características principales de los tipos moleculares de cáncer de mama.** ER: receptor de estrógeno; PR: receptor de progesterona; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2. +: Positivo. -: negativo. +/-: ocasionalmente positivo. -/+ : raramente positivo. Adaptado de (Weigelt *et al.*, 2010a, Weigelt *et al.*, 2010b, Eroles *et al.*, 2012).

Además de por las características moleculares y del tipo histológico, el cáncer de mama se clasifica por su estadio, según el sistema de estadificación TNM, dependiendo de tres parámetros: el tamaño del tumor, el número de ganglios linfáticos afectados y la presencia o ausencia de metástasis (Tabla 2) (Edge y Compton, 2010).

# Introducción

| Estadio | T           | N           | M  |
|---------|-------------|-------------|----|
| 0       | Tis         | N0          | M0 |
| IA      | T1          | N0          | M0 |
| IB      | T0          | N1          | M0 |
|         | T1          | N1          | M0 |
| IIA     | T0          | N0          | M0 |
|         | T1          | N1          | M0 |
|         | T2          | N1          | M0 |
| IIB     | T2          | N1          | M0 |
|         | T3          | N0          | M0 |
| IIIA    | T0          | N2          | M0 |
|         | T1          | N2          | M0 |
|         | T2          | N2          | M0 |
|         | T3          | N1          | M0 |
|         | T3          | N2          | M0 |
| IIIB    | T4          | N0          | M0 |
|         | T4          | N1          | M0 |
|         | T4          | N2          | M0 |
| IIIC    | Cualquier T | N3          | M0 |
| IV      | Cualquier T | Cualquier N | M1 |

| Tumor primario (T)      |                                                                                                                |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tx                      | El tumor primario no puede ser evaluado                                                                        |
| T0                      | No hay evidencia de tumor primario                                                                             |
| Tis                     | Carcinoma <i>in situ</i>                                                                                       |
| T1                      | Tumor de dimensión igual o menor a 2 cm                                                                        |
| T2                      | Tumor con una dimensión entre 2 y 5 cm                                                                         |
| T3                      | Tumor mayor de 5 cm                                                                                            |
| T4                      | Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a piel o a la pared torácica                                   |
| Ganglios linfáticos (N) |                                                                                                                |
| Nx                      | No puede evaluarse la invasión en los nódulos linfáticos                                                       |
| N0                      | No hay invasión en los nódulos linfáticos                                                                      |
| N1                      | Invasión de ganglios linfáticos ipsilaterales axilares móviles                                                 |
| N2                      | Invasión de ganglios linfáticos ipsilaterales axilares fijos                                                   |
| N3                      | Invasión de ganglios linfáticos infraclaviculares o supraclaviculares; o invasión de ganglios mamaros internos |
| Metástasis distante (M) |                                                                                                                |
| Mx                      | No puede evaluarse la metástasis distante                                                                      |
| M0                      | No hay metástasis distante                                                                                     |
| M1                      | Hay metástasis distante                                                                                        |

**Tabla 2: Estadificación del cáncer de mama según la clasificación del Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC).** El estadio se determinará dependiendo de la clasificación T (tumor primario), N (ganglios linfáticos) y M (metástasis), que cada tumor tenga en el momento que se analice.

El tratamiento del cáncer de mama depende del estadio (Manchon *et al.*, 2010):

- Estadios I, II, IIIA y IIIC operable: Cirugía conservadora o mastectomía más extirpación de los ganglios axilares mediante la técnica del ganglio centinela. Quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas (doxorubicina) y taxanos (paclitaxel). Hormonoterapia si el tumor es dependiente de hormonas, y dependiendo de si la paciente es premenopáusica o postmenopáusica el tratamiento será con tamoxifeno o inhibidores de aromatasa, respectivamente. Trastuzumab o lapatinib, si el tumor es Her2+.

- Estadios IIIB y IIIC no operable: Quimioterapia. Radioterapia tras la quimioterapia. Hormonoterapia si procede, y trastuzumab si el tumor es Her2+.

- Estadio IV: En este estadio, y debido al estado tan avanzado de la enfermedad, el objetivo del tratamiento es paliativo, pues las posibilidades de curación son muy bajas.

Aunque la supervivencia al cáncer de mama es muy alta, la alta incidencia y la complejidad molecular e histológica de estos tumores, producen casi medio millón de defunciones a nivel mundial anualmente, por lo que es muy importante continuar con el estudio de este tipo de cáncer para comprender la compleja biología molecular de estos tumores, desarrollar fármacos efectivos contra ellos, y aplicar una terapia más eficaz para cada paciente.

## **2.3 El ciclo de Kennedy: de colina a fosfatidilcolina**

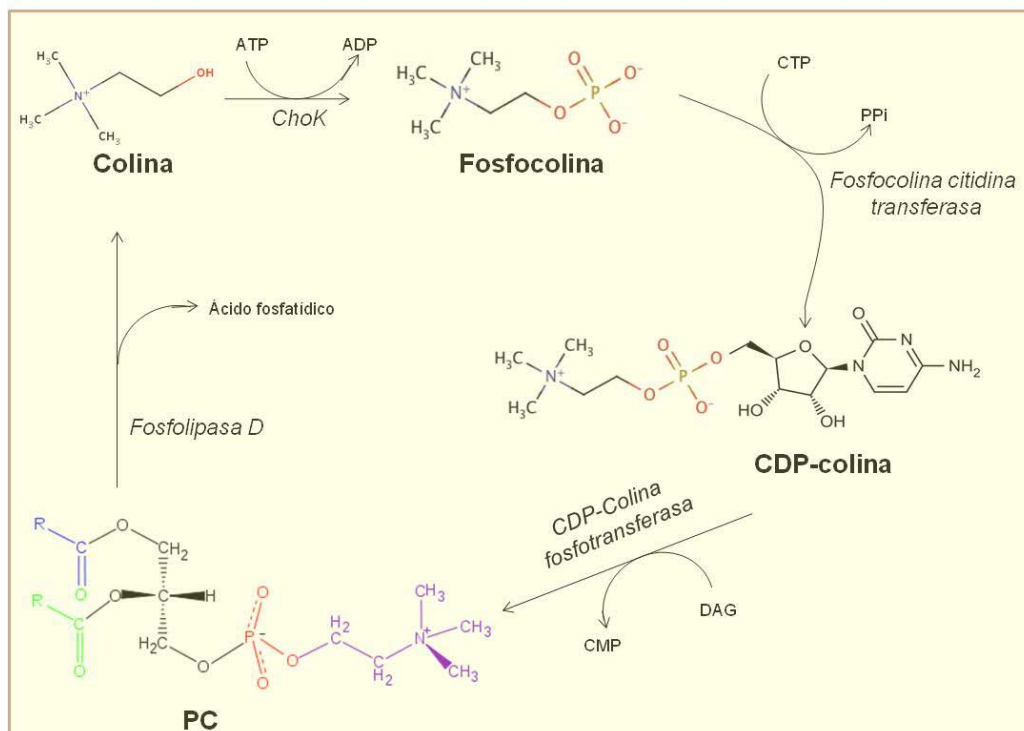
La colina (Cho) es un nutriente esencial en la dieta humana, siendo necesaria para la síntesis de lípidos de membrana como la fosfatidilcolina (PC) y la esfingomielina (SM) (Zeisel *et al.*, 1991). Penetra en las células por difusión pasiva o bien por difusión facilitada mediante un sistema ubicuo de transporte específico de baja afinidad. En el sistema nervioso existe un sistema específico de alta afinidad para transportar colina al interior de las neuronas (Pelech y Vance, 1984).

El ciclo de la CDP-colina, también denominado ciclo de Kennedy o de síntesis de fosfatidilcolina, fue descrito por primera vez en 1957 por Eugene P. Kennedy indicando que la síntesis de PC se realiza mediante un intermediario de colina, la citidina difosfocolina (CDP-colina) (Kennedy, 1957). El ciclo de Kennedy consta de tres reacciones. La primera, la fosforilación de colina en fosfocolina (PCho) mediante el enzima colina quinasa (ChoK). La segunda, la adición de un grupo citidil mediante una citidil transferasa, está considerada como la etapa limitante del ciclo de Kennedy. Y la tercera reacción, la adición de un diacilglicerol (DAG) gracias a una fosfotransferasa. La acción de la fosfolipasa D (PC-PLD), cierra el ciclo volviendo a generar colina libre (Pelech y Vance, 1984, Fagone y Jackowski, 2013) y ácido fosfatídico (PA) (Figura 2), que a su vez es hidrolizado en ácido lisofosfatídico (LPA) o DAG, cuyas cascadas de señalización son mitogénicas (Billah y Anthes, 1990, Nishizuka, 1992, Zeisel, 1993).

El ciclo de Kennedy tiene una variante responsable de la síntesis de fosfatidiletanolamina (PE) a partir de etanolamina, conectado con el ciclo clásico ya que PE puede convertirse en PC a través del enzima fosfatidiletanolamina metiltransferasa (PEMT) (Blusztajn *et al.*, 1979). Los enzimas que gobiernan esta ruta alternativa son diferentes a los del ciclo de Kennedy propiamente dicho, aunque la acción enzimática es similar.

# Introducción

PC es el fosfolípido más abundante de la membrana plasmática, representando en algunos casos más del 50% del total de la membrana plasmática (Pelech y Vance, 1984).



**Figura 2. Ciclo de Kennedy.** En negrita se representan los metabolitos. En cursiva los enzimas responsables de cada paso enzimático. El sentido de las flechas indica la dirección de la síntesis con la entrada o salida de otros compuestos participantes en las diferentes reacciones del ciclo. CTP, citidina trifosfato.

## 2.4 Colina quinasa y su papel en la tumorigénesis

El enzima colina quinasa es la responsable de la fosforilación de colina a fosfocolina en una reacción que usa como cofactores ATP y magnesio (Wittenberg y Kornberg, 1953). El gen que codifica para colina quinasa en levaduras fue clonado en 1989 (Hosaka *et al.*, 1989), y en 1992 el mismo grupo clonó el gen que codifica para el enzima humana (Hosaka *et al.*, 1992). Hay tres isoformas diferentes de ChoK en humanos (ChoK $\alpha$ 1, ChoK $\alpha$ 2 y ChoK $\beta$ ) codificadas por dos genes *CHKA* y *CHKB* (Aoyama *et al.*, 2004). Las tres isoformas de ChoK tienen actividad colina quinasa y etanolamina quinasa *in vitro* (Aoyama *et al.*, 1998). Recientemente se ha descrito que en células enteras, la ChoK $\alpha$ 1 manifiesta tanto actividad colina quinasa como etanolamina quinasa, mientras que en esas condiciones, la actividad de ChoK $\beta$  es exclusivamente etanolamina quinasa (Gallego-Ortega *et al.*, 2009). La ChoK humana actúa

como dímero, tanto homo- como heterodímero, siendo el homodímero  $\alpha/\alpha$  el que posee mayor actividad enzimática, y el homodímero  $\beta/\beta$  el de menor actividad enzimática medida por su capacidad de convertir colina en fosfocolina en sistemas *in vitro* (Aoyama *et al.*, 2002).

La primera sospecha de una posible función del ciclo de Kennedy en la regulación de la proliferación celular y su posible alteración en cáncer data de los estudios pioneros de resonancia magnética nuclear donde se observó que los niveles de fosfocolina y fosfoetanolamina estaban elevados en tejidos tumorales comparados con sus respectivos tejidos normales (Glunde *et al.*, 2011). La primera relación entre los niveles de PCho y un incremento de actividad de colina quinasa datan de 1987, donde se encuentran niveles elevados de este metabolito en células transformadas por el oncogén *RAS* (Lacal *et al.*, 1987, Lacal, 1990), debido a un incremento en la actividad de ChoK $\alpha$  (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1997, Ramirez de Molina *et al.*, 2001). Otros oncogenes como *SRC*, *RAF* y *MOS*, también incrementan la actividad ChoK tras la transformación (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha descrito que PCho es necesario para la síntesis de ADN en la mitogénesis inducida por factores de crecimiento, y es mitogénico cuando se añade exógenamente a fibroblastos (Cuadrado *et al.*, 1993).

Los niveles proteicos de ChoK $\alpha$  están elevados en líneas celulares procedentes de tumores humanos comparados con los de sus correspondientes líneas primarias (Ramirez de Molina *et al.*, 2004, Ramirez de Molina *et al.*, 2007, Hernando *et al.*, 2009, Iorio *et al.*, 2010, de la Cueva *et al.*, 2013), y en diferentes tumores humanos de mama, colon, pulmón, próstata y ovario, respecto a su tejido normal adyacente (Ramirez de Molina *et al.*, 2002a, Ramirez de Molina *et al.*, 2002b, Iorio *et al.*, 2010) Además, las líneas derivadas de tumores humanos tienen una gran actividad de ChoK y altos niveles de PCho (Bhakoo *et al.*, 1996, Ramirez de Molina *et al.*, 2002a) y también los tumores (Nakagami *et al.*, 1999, Iorio *et al.*, 2005). Por último, se ha demostrado que ChoK $\alpha$  es un factor pronóstico asociado a una menor supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y hepatocarcinoma (Ramirez de Molina *et al.*, 2007, Kwee *et al.*, 2012).

El posible mecanismo molecular por el que ChoK $\alpha$  aumenta la proliferación y participa en la transformación celular, es el aumento de la expresión del enzima, que controla la expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular como son las ciclinas y otras proteínas reguladoras de ciclo celular como p21 (Ramirez de Molina *et al.*, 2008, Gruber *et al.*, 2012).

# Introducción

---

En base a estos resultados, la ChoK $\alpha$  se ha considerado como una nueva diana terapéutica en cáncer, pues su sobreexpresión coopera en la inducción de tumores y su inhibición tiene efecto antitumoral en modelos murinos (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1999, Ramirez de Molina *et al.*, 2005). La relevancia de ChoK $\alpha$  en carcinogénesis humana ha permitido por tanto el desarrollo de una novedosa estrategia antitumoral (Lacal, 2001).

La primera molécula usada como inhibidor de colina quinasa fue el Hemicolinio-3 (HC-3) (Wittenberg y Kornberg, 1953). Debido a su gran toxicidad en los terminales nerviosos colinérgicos donde interfiere con el transportador de acetilcolina y provoca parálisis respiratoria, es imposible usarlo en clínica (Cannon, 1994). Sin embargo, el HC-3 ha servido como base para la generación de nuevos inhibidores de la colina quinasa más específicos y menos tóxicos (Campos *et al.*, 2000, Campos *et al.*, 2001, Conejo-Garcia *et al.*, 2003, Sanchez-Martin *et al.*, 2005). Entre estos compuestos el MN58b (Figura 3) ha servido de herramienta para dilucidar el mecanismo de acción antitumoral de los inhibidores de ChoK gracias a sus propiedades antiproliferativas tanto *in vitro* como *in vivo*. Este compuesto ha servido para validar la inhibición de ChoK $\alpha$  como estrategia antitumoral (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1997, Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1999).

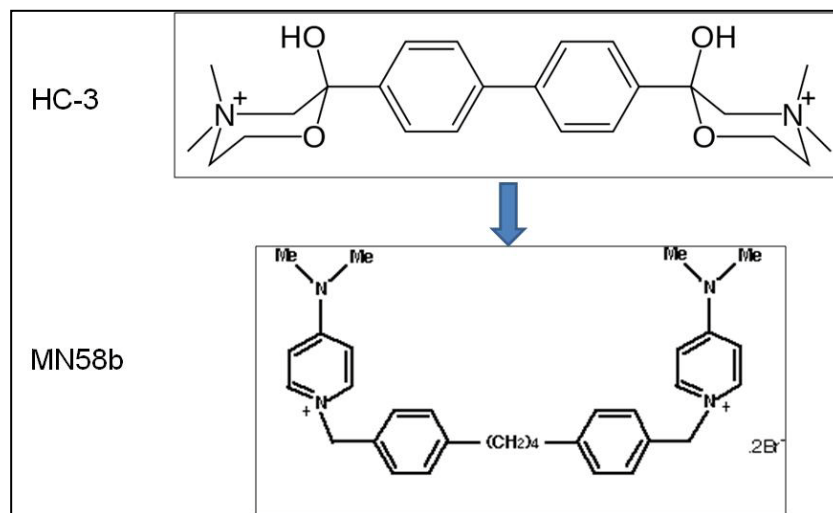
El MN58b es un inhibidor de ChoK $\alpha$ , 21 veces más potente frente a este isoenzima que frente a ChoK $\beta$  (Gallego-Ortega *et al.*, 2009). Este compuesto tiene un efecto diferencial, ya que las células tumorales entran irreversiblemente en apoptosis mientras que las células primarias no tumorales sufren una parada de ciclo celular reversible al retirar el tratamiento (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2004, Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2005). Su mecanismo de acción ha sido asociado con un incremento específico en ceramidas, metabolitos asociados a muerte celular por apoptosis (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2004).

La inhibición de ChoK $\alpha$ , mediante ARN de interferencia (ARNi) (Banez-Coronel *et al.*, 2008, Yalcin *et al.*, 2010); o por diferentes fármacos usados por otros grupos (Clem *et al.*, 2011), han validado las observaciones iniciales de nuestro grupo mediante inhibición farmacológica directa con el MN58b, pues obtienen resultados parecidos en cuanto a respuesta celular se refiere.

La inhibición de ChoK $\alpha$  bloquea dos de las rutas más importantes en supervivencia celular, la vía de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), ya que induce la defosforilación de Akt en la posición serina 473 (Chua *et al.*, 2009, Clem *et al.*, 2011) y la ruta de las MAP quinasas (Yalcin *et al.*, 2010, Clem *et al.*, 2011).



Todos estos resultados validan a la inhibición farmacológica de ChoK $\alpha$  para su utilización en clínica como nueva estrategia antitumoral, y han sentado las bases para el diseño de una tercera generación de inhibidores de ChoK $\alpha$ , mejorando su capacidad antitumoral y disminuyendo la toxicidad del fármaco. De entre ellos, el (Figura 3) se ha seleccionado como molécula líder.



**Figura 3. Estructura de los diferentes inhibidores de ChoK.** HC-3, Hemicolinio-3. Me, grupo metilo.

Ambos inhibidores de ChoK $\alpha$  modulan la metabolización del 5 fluorouracilo (5FU), fármaco ampliamente usado en quimioterapia, produciendo una combinatoria sinérgica con este fármaco en sistemas celulares derivados de tumores de colon tanto *in vitro* como *in vivo* (de la Cueva et al., 2013).

Por último, se ha descrito que la ceramidasa ácida (*ASAH1*), implicada en drenar ceramidas, participa en la generación de resistencia a los inhibidores de colina quinasa en tumores primarios y en células derivadas de tumores no microcíticos de pulmón (Ramirez de Molina *et al.*, 2012) y que el tratamiento conjunto de inhibidores de la ceramidasa ácida e inhibidores de ChoK $\alpha$  producen un efecto antitumoral sinérgico en este sistema celular, lo que sugiere una posible terapia combinada con inhibidores de estos dos enzimas en pacientes poco sensibles a los inhibidores de ChoK $\alpha$ .

Estudios más recientes han demostrado que la inhibición de ChoK $\alpha$  puede conseguirse mediante la inhibición competitiva de la unión de colina o de ATP de forma

independiente (Hudson *et al.*, 2013, Sahun-Roncero *et al.*, 2013). Estos resultados ponen de manifiesto que es posible conseguir la inhibición de la actividad ChoK $\alpha$  mediante estrategias alternativas y complementarias.

## **2.5 Colina quinasa y cáncer de mama**

El metabolismo de colina juega un papel muy relevante en el cáncer de mama, pues existe en los tumores de pacientes con cáncer de mama una correlación entre la actividad ChoK y el grado histológico del tumor (Ramirez de Molina *et al.*, 2002a). Además, las células normales extraídas de tejido mamario, tienen más colina, pero menos PCho que las células tumorales, y estas últimas tienen una alta expresión de ChoK $\alpha$  (Ramirez de Molina *et al.*, 2002b, Cao *et al.*, 2012). Por último, las células tumorales poseen más receptores de calcio (Huang *et al.*, 2009) y mayor actividad de los transportadores de colina (Morse *et al.*, 2009) en la membrana plasmática, que aumentarían aún más la actividad de ChoK y por tanto el incremento de los niveles de PCho en las células tumorales respecto a las células primarias (Glunde *et al.*, 2004).

La inhibición farmacológica de ChoK $\alpha$  disminuye la cantidad de PCho en los tumores y el tamaño de estos (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1997, Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1999, Al-Saffar *et al.*, 2006, Krishnamachary *et al.*, 2009), induciendo apoptosis en células tumorales pero no en las células primarias (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2005, Banez-Coronel *et al.*, 2008).

Estudios en resistencia a 5FU, demuestran que la inhibición de ChoK $\alpha$  mediante ARNi disminuye el consumo de colina de las células tumorales, necesaria para el crecimiento celular, y disminuye también el consumo de timidina aumentando la sensibilidad por este fármaco (Mori *et al.*, 2007, Nimmagadda *et al.*, 2009). Por otro lado, la sobreexpresión de ChoK $\alpha$  se correlaciona con un aumento de la expresión del gen timidilato sintasa, implicado en la generación de resistencia al 5FU (Shah *et al.*, 2010).

A nivel molecular, además de la inhibición de la fosforilación de Akt por la inhibición de ChoK $\alpha$  (Chua *et al.*, 2009, Clem *et al.*, 2011) se ha descrito la relación a nivel proteico de ChoK $\alpha$  con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en presencia del proto-oncogen *SRC* (Miyake y Parsons, 2012).

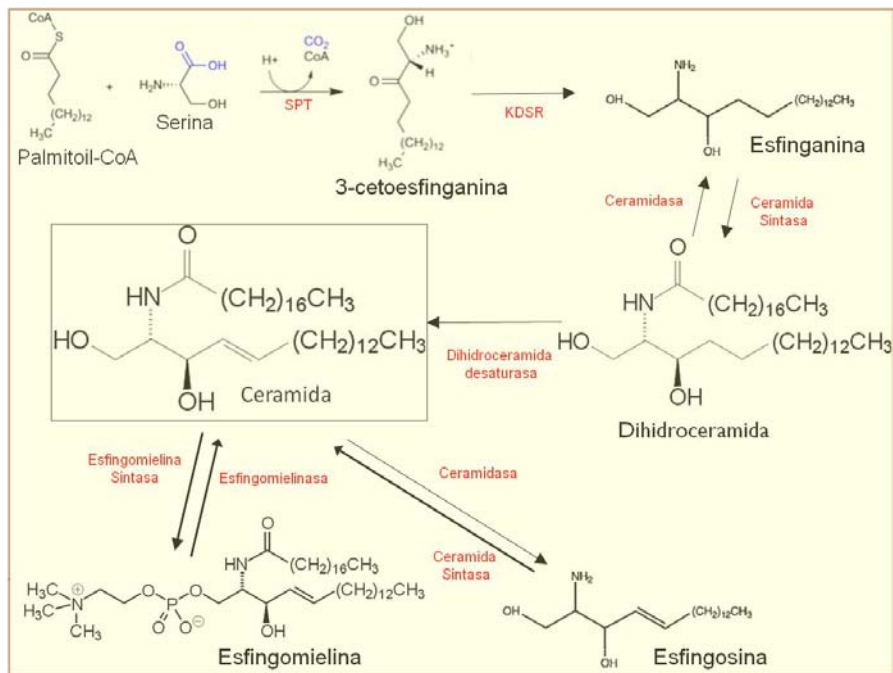
## **2.6 Esfingolípidos: ceramidas y su metabolismo**

Los esfingolípidos son constituyentes esenciales para las membranas de las células eucariotas. Fueron descubiertos por Johann Thudichum en 1884, aunque es en 1947 cuando se caracterizan estructuralmente (Pruett *et al.*, 2008).

Dentro de los esfingolípidos se encuentran las ceramidas, esfingomielinas, gangliósidos y cerebrósidos, todos ellos moléculas anfipáticas que comparten una estructura común, una base esfingoide, que principalmente es esfingosina, esfinganina, o fitoesfingosina (Futerman y Hannun, 2004, Zheng *et al.*, 2006, Pruet *et al.*, 2008) (Figura 4).

La ceramida (Cer) es el esfingolípidos más sencillo de todos, pero a su vez el esfingolípidos central, pues participa en todas las rutas de síntesis del resto de esfingolípidos. Las rutas que regulan la generación de ceramidas incluyen las siguientes alternativas:

1. **La síntesis *de novo*.** Se localiza en el retículo endoplasmático y comienza con la condensación de serina y palmitoil-CoA por medio del enzima serina palmitoil transferasa (SPT) resultando en 3-cetoesfinganina, la cual se reduce a esfinganina, por acción del enzima KDSR. Los enzimas ceramidas sintasas (CerS) añaden un ácido graso a la esfinganina generando dihidroceramida (DH-Cer) sobre la cual actúa una desaturasa (*DEGS*) eliminando un doble enlace entre el carbono 4 y 5 de la base esfingoide generando ceramida (Figura 4) (Hannun y Obeid, 2002, Merrill, 2002, Kravka *et al.*, 2007). En humanos existen seis ceramidas sintasas, generando ceramidas con diferentes cadenas de ácidos grasos (Levy y Futerman, 2010, Hannun y Obeid, 2011, Mullen *et al.*, 2012). Las ceramidas más comunes son las de 16 a 24 átomos de carbono (Bielawska *et al.*, 2001, Mimeault, 2002, Ogretmen, 2006).



**Figura 4. Síntesis de novo de ceramidas.** En la imagen se muestra la dihidroceramida, ceramida y esfingomielina unidas a un ácido graso de 16 átomos de carbono. En rojo se representan los enzimas encargados de cada etapa.

- 2. Hidrólisis y síntesis de esfingomielina.** La esfingomielina es un esfingolípido compuesto de ceramida y fosfocolina que se encuentra en la membrana plasmática, retículo endoplasmático, lisosoma, citosol y núcleo. Dependiendo del pH del compartimento en el que se encuentre, la hidrólisis de SM tiene lugar por acción de una esfingomielinasa (SMasa) diferente generando ceramida y PCho (Figura 5). Las SMasas pueden ser ácida, neutra o alcalina (Marchesini y Hannun, 2004, Jenkins *et al.*, 2009).

La SM se sintetiza en el aparato de Golgi, a partir de una molécula de PC y otra de Cer por medio de las esfingomielinas sintasas (*SGMS1*), en el retículo endoplasmático o en la membrana plasmática (*SGMS2*) (Tafesse *et al.*, 2006, Villani *et al.*, 2008, Holthuis y Luberto, 2010) (Figura 5).

- 3. Ruta de salvamento y degradación de esfingolípidos.** Se conoce como ruta de salvamento a la síntesis de ceramida a través de la acilación de esfingosina por la acción de los enzimas ceramidas sintasas. Este paso es reversible pues sobre las ceramidas pueden actuar diferentes ceramidases, ácidas, neutras, o alcalinas,

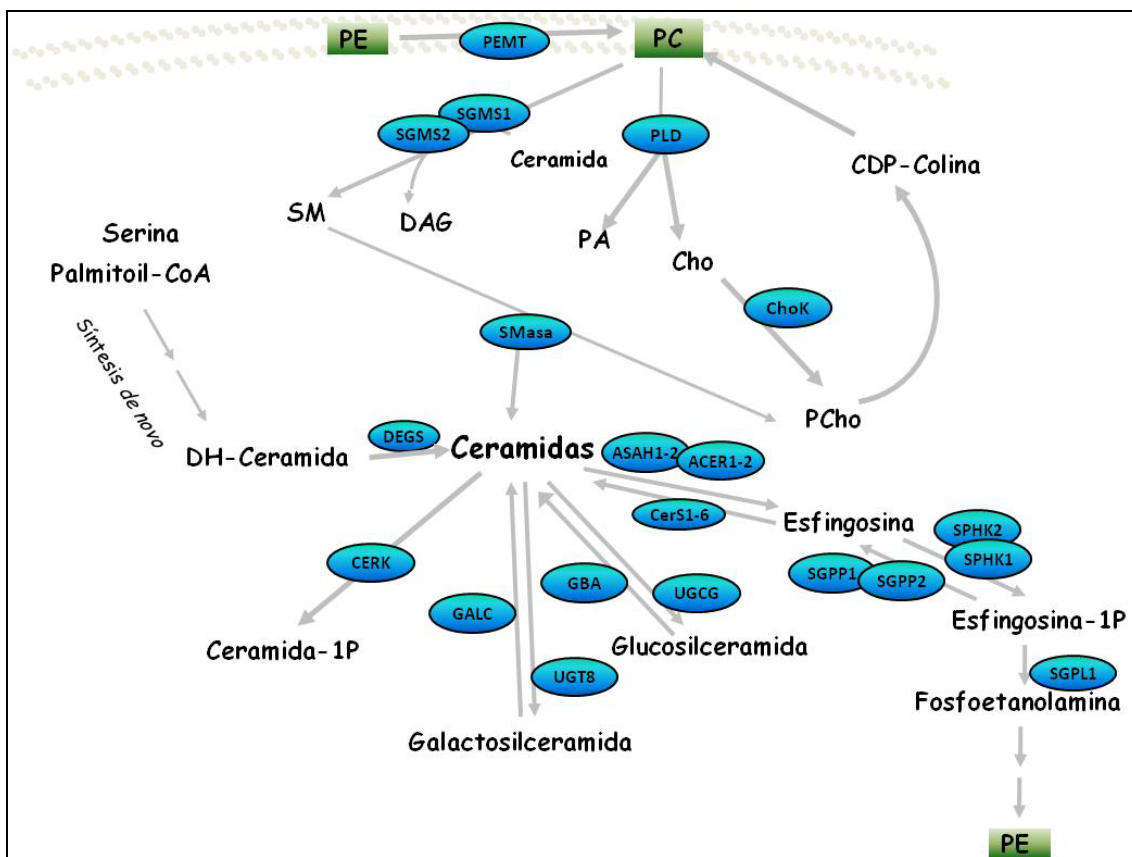
dependiendo del compartimento en el que se encuentre la ceramida, generando esfingosina y un ácido graso (Koch *et al.*, 1996, El Bawab *et al.*, 2000, Mao *et al.*, 2001). Las ceramidasa pueden actuar también sobre DH-Cer, generando esfinganina en lugar de esfingosina.

La esfingosina o esfinganina, pueden ser fosforiladas por las esfingosinas quinasas generando esfingosina-1-fosfato (S1P) o esfinganina-1-fosfato (SaP), respectivamente. Esta fosforilación se revierte por la acción de las fosfatasas de esfingosina-1-fosfato (Hait *et al.*, 2006, Pyne *et al.*, 2009, Maceyka *et al.*, 2012).

La forma de degradar los esfingolípidos es a través de la esfingosina fosfato liasa (*SGPL1*) que actúa sobre S1P y SaP para generar fosfoetanolamina y hexadecanal (hexadecenal en el caso de SaP) (Ogretmen, 2006, Bandhuvula y Saba, 2007, Hannun y Obeid, 2008, Bartke y Hannun, 2009, Gault *et al.*, 2010) (Figura 5).

- 4. Biosíntesis de esfingolípidos complejos.** Las ceramidas se pueden transportar al aparato de Golgi por medio de transporte vesicular generando esfingolípidos como las galactosilceramidas y glucosilceramidas, precursoras a su vez de esfingolípidos más complejos como son las lactosilceramidas y gangliósidos. Otra forma de transporte de ceramidas al aparato de Golgi es por medio de una proteína transportadora de ceramidas (CERT), produciéndose síntesis de SM (Yamaji *et al.*, 2008, Bartke y Hannun, 2009, van Echten-Deckert y Walter, 2012).

Las ceramidas tienen una gran importancia en cáncer. Los niveles de ceramidas aumentan como consecuencia del tratamiento con diversos fármacos anticancerígenos resultando en la inducción de muerte celular (Rodríguez-Gonzalez *et al.*, 2004, Dickson *et al.*, 2011, Mullen *et al.*, 2011). Actualmente, muchos enzimas implicados en las rutas en las que participan las ceramidas son estudiados como posibles nuevas dianas terapéuticas y diferentes inhibidores para estos enzimas están siendo desarrollados (Canals *et al.*, 2011, Adan-Gokbulut *et al.*, 2013). Por otro lado, mecanismos celulares encargados de generar resistencia a fármacos anticancerígenos consisten en drenar las cantidades de ceramidas a otros metabolitos evitando así sus efectos tóxicos (Sietsma *et al.*, 2001, Ramirez de Molina *et al.*, 2012, Kartal Yandim *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2013). Las ceramidas son, pues, metabolitos muy importantes que participan en diferentes rutas metabólicas, relacionándose en algunas de ellas con PC y PCho (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de las rutas metabólicas en las que está implicada la ceramida y su conexión con el ciclo de Kennedy y colina quinasa.** En círculos se representa los enzimas que gobiernan los diferentes pasos en cada ruta. Cho, colina; DAG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; PC: fosfatidilcolina; PCho, fosfocolina; PE: fosfatidiletanolamina; PLD: fosfolipasa D; SM: esfingomielina; SMasa: esfingomielinasa.

## 2.7 Papel de las ceramidas en cáncer

Aunque durante muchos años los esfingolípidos fueron considerados como meros componentes estructurales de las membranas, actualmente se considera que también juegan importantes funciones en señalización celular con una gran implicación tanto en la regulación de la apoptosis, como en la proliferación celular (Ogretmen y Hannun, 2004, Taha *et al.*, 2006, Morales *et al.*, 2007, Hannun y Obeid, 2008, Maceyka *et al.*, 2012, Pyne *et al.*, 2012, Morad y Cabot, 2013).

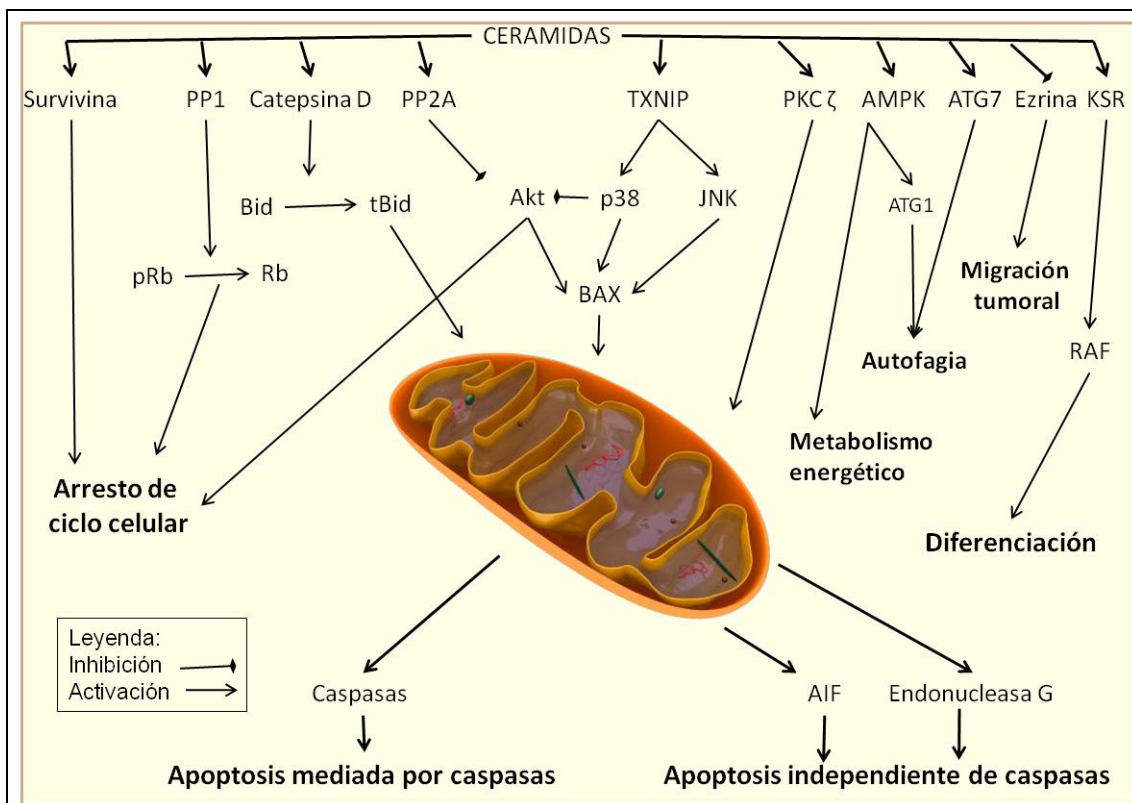
A principios de los años 90 se comprobó que las ceramidas añadidas exógenamente inducían fragmentación de ADN en células tumorales, signo inequívoco de muerte celular, efecto que sólo ocurría con la adición de ceramidas pero no con las formas DH-Cer (Obeid *et al.*, 1993, Ji *et al.*, 1995).

Las ceramidas son mediadores de la respuesta de estrés celular (Hannun, 1996) teniendo funciones en diferenciación celular (Furuya *et al.*, 1998); arresto del ciclo celular (Dbaibo *et al.*, 1995, Lee *et al.*, 1998); autofagia (Scarlati *et al.*, 2004); senescencia (Venable *et al.*, 1995) y apoptosis (Hannun y Obeid, 1995). Todas estas funciones son debidas a la interacción de las ceramidas con diferentes proteínas (Taha *et al.*, 2006, Morad y Cabot, 2013, Saddoughi y Ogretmen, 2013) (Figura 6).

Las ceramidas se unen a la proteína fosfatasa 2A (PP2A), entre sus funciones están la inhibición a Akt, lo que conduce a la muerte celular (Chalfant *et al.*, 1999). También se unen a la proteína fosfatasa 1 (PP1) implicada en la defosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb), induciendo parada del ciclo celular (Alesse *et al.*, 1998).

La quinasa supresora de RAS (KSR) es otra de las dianas de las ceramidas (Zhang *et al.*, 1997), estimulando su autofosforilación. KSR es un enzima integrante de la cascada de señalización de los oncogenes *RAS* y *RAF*, ambos implicados en diferenciación celular. Otra quinasa que interacciona con las ceramidas es la proteína quinasa C  $\zeta$  (PKC  $\zeta$ ) (Bourbon *et al.*, 2000), implicada en apoptosis mediada por caspasas (Sumitomo *et al.*, 2002).

JNK y p38 son proteínas que regulan el crecimiento celular, la diferenciación celular y la apoptosis. Ambas proteínas están incrementadas cuando hay un aumento de ceramidas, a través de la unión con la proteína de interacción con tioredoxina (TXNIP) (Chen *et al.*, 2008). Ambas proteínas junto con Akt pueden activar a BAX, una proteína mitocondrial implicada en la apoptosis mediada por mitocondria (Morad y Cabot, 2013).



**Figura 6. Esquema de las interacciones de ceramida con diferentes proteínas y algunas de sus funciones celulares.** Las ceramidas activan proteínas como catepsina D, PP2A, TXNIP, PKC $\zeta$ , que acaba n creando poros en las mitocondrias, las cuales liberan diferentes proteínas que activan la muerte celular. Otras proteínas diana de las ceramidas están implicadas en arresto del ciclo celular (survivina, PP1, Akt), autofagia (ATG), metabolismo energético (AMPK), migración (ezrina) y diferenciación (KSR/RAF). AIF: factor de inducción de apoptosis; AMPK: quinasa activada por AMP; KSR: quinasa supresora de Ras; PKC  $\zeta$ : proteína quinasa c  $\zeta$ ; PP1: proteína fosfatasa 1; PP2A: proteína fosfatasa 2A; Rb: proteína del retinoblastoma; pRb: proteína del retinoblastoma fosforilada; tBid: proteína Bid truncada; TXNIP: proteína de interacción con tioredoxina. Adaptado de (Morad y Cabot, 2013).

Otras dianas de las ceramidas son catepsina D (Heinrich *et al.*, 1999), enzima lisosomal directamente relacionada con el truncamiento de Bid, una de las proteínas iniciadoras de la apoptosis mediada por mitocondria, y ezrina (Canals *et al.*, 2010), proteína de membrana implicada en la migración tumoral.

Por último, las ceramidas también interaccionan con proteínas implicadas en el metabolismo energético, como la quinasa activada por AMP (AMPK), la autofagia, uniéndose a proteínas de la familia ATG, y ciclo celular, como survivina (Morad y Cabot, 2013) (Figura 6).



Estudios recientes muestran como las ceramidas unidas a diferentes ácidos grasos pueden tener funciones opuestas, así la Cer C-18 (ceramida unida a un ácido graso de 18 átomos de carbono), producida principalmente por CerS1, suprime el crecimiento tumoral en células de cáncer de cabeza y cuello, mientras que la Cer C-16, sintetizada mayoritariamente por CerS6, induce el crecimiento tumoral en las mismas células (Koybasi *et al.*, 2004, Senkal *et al.*, 2007, Senkal *et al.*, 2010, Senkal *et al.*, 2011).

Por otro lado, en pacientes de cáncer de mama se ha correlacionado los altos niveles de Cer C-16 con la invasión a ganglios linfáticos (Schiffmann *et al.*, 2009), y se ha descrito una elevada expresión de los genes que codifican para CerS2 y CerS6 (Erez-Roman *et al.*, 2010), indicando que las diferentes cadenas de ácido graso unidas a ceramida tienen diferentes efectos en cáncer (Grosch *et al.*, 2012).

### **2.8 Papel de esfingosina-1-fosfato y ceramida-1-fosfato en cáncer**

Los esfingolípidos S1P y ceramida-1-fosfato (Cer-1P) tienen funciones opuestas a las descritas para las ceramidas (Gangoiti *et al.*, 2008a, Ponnusamy *et al.*, 2010). La S1P se forma por la fosforilación de esfingosina por los enzimas esfingosina quinasa 1 (SK1) y 2 (SK2). La SK1 actúa en el citoplasma y la SK2 en el núcleo. S1P puede quedarse dentro de la célula o secretarse al exterior, donde es sustrato de 5 receptores específicos en la membrana celular. De esta forma S1P tiene funciones autocrinas o paracrinas (Rosen y Goetzl, 2005).

La conversión de ceramida a S1P se asocia con progresión del ciclo celular y proliferación (Zhang *et al.*, 1990, Zhang *et al.*, 1991, Olivera *et al.*, 1999). Además de promover la supervivencia celular, S1P inhibe la apoptosis (Cuvillier *et al.*, 1996, Spiegel y Milstien, 2003), y la liberación de péptidos pro-apoptóticos mitocondriales causados por las ceramidas (Cuvillier y Levade, 2001).

El enzima SK1 también está asociado con la tumorigénesis, pues se ha observado una elevada expresión de la proteína en pacientes con cáncer de estómago, pulmón, cerebro, colon, riñón, mama y linfoma no-Hodgkin (Pyne y Pyne, 2010). En cáncer de mama, la expresión incrementada de SK1 se ha correlacionado con un peor pronóstico de las pacientes y con resistencia a quimioterapéuticos (Long *et al.*, 2010). Es interesante resaltar el efecto

## Introducción

---

opuesto que tiene SK2, pues su sobreexpresión puede tener efectos apoptóticos (Igarashi *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2003).

La ceramida puede fosforilarse a ceramida-1-fosfato gracias al enzima ceramida quinasa (CERK). La Cer-1P tiene efectos opuestos a Cer ya que activa las rutas de señalización de supervivencia MAPK/ERK, PI3K/Akt y JNK (Boath *et al.*, 2008). Además inhibe PP2A y PP1, efectos opuestos a los que realizan las ceramidas (Gangoiti *et al.*, 2008b) (Figura 6). Finalmente, Cer-1P activa a dos fosfolipasas de PC, PLA2G4A y PLA2G6, liberando ácido araquidónico, precursor de la síntesis de eicosanoides, mediadores de la respuesta inflamatoria (Pettus *et al.*, 2005) y Liso-PC, un potente mitógeno (Billah y Anthes, 1990, Nishizuka, 1992, Zeisel, 1993).

Todo esto hace que la regulación de los esfingolípidos sea un evento fundamental en las células tumorales tanto en los procesos de muerte celular, como en los procesos de supervivencia, apoyando que su estudio tenga una gran relevancia en los mecanismos de acción de los fármacos antitumorales y sus mecanismos de resistencia.

## ***OBJETIVOS***

---



### 3 Objetivos

1.- Estudio del mecanismo de acción antitumoral de los inhibidores de ChoK $\alpha$  en el sistema modelo de tumores de mama.

2.- Identificación de los posibles mecanismos de generación de resistencia a la actividad antiproliferativa de los inhibidores de ChoK $\alpha$  en el sistema modelo de tumores de mama.



***MATERIALES Y MÉTODOS***

---





## 4 Materiales y métodos

### 4.1 Fármacos e inhibidores enzimáticos

Los diferentes inhibidores y fármacos usados en esta Tesis se recogen en la Tabla 3, con la concentración stock, la concentración de trabajo, la solubilidad y el proveedor del producto.

| Fármaco/reactivo | Abreviatura | Vehículo         | Concentración stock | Concentración trabajo | Proveedor                 |
|------------------|-------------|------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|
| MN58b            | MN          | H <sub>2</sub> O | 5 mM                | 15 µM                 | Universidad de Granada    |
| RSM932A          | RSM         |                  |                     |                       |                           |
| Fumonisin B1     | FBI         | PBS              | 5 mM                | 50 µM                 | ENZO (BML-SL220-0001)     |
| Miriocina        | Myr         | DMSO             | 5 mM                | 100 nM                | Sigma-Aldrich (M1177-5MG) |
| Desipramina      | DES         | MetOH            | 10 mM               | 25 µM                 | Sigma-Aldrich (D3900-1G)  |
| GW4869           | GW          | DMSO 5% MSA      | 2 mM                | 10 µM                 | Sigma-Aldrich (D1692-5MG) |
| D-erythro-MAPP   | DMAPP       | EtOH             | 10 mM               | 10 µM                 | Cayman(#10165)            |
| z-VAD            | ZVAD        | DMSO             | 20 mM               | 20 µM                 | Promega (G7231)           |
| Topotecan        | TOPO        | DMSO             | 10 mM               | 2 µM                  | Sigma-Aldrich (T2705)     |

**Tabla 3. Información de los fármacos y reactivos usados.** v/v: relación volumen/volumen; mM: milimolar; µM: micromolar; nM: nanomolar. Entre paréntesis aparece la referencia comercial del compuesto. MetOH: Metanol; MSA: Ácido metasulfónico; EtOH: Etanol.

### 4.2 Cultivos celulares

Todas las líneas celulares utilizadas en esta Tesis proceden de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC). Se han comparado tres líneas derivadas de tumores de mama humanos: MCF7 (HTB-22), MDA-MB 231 (HTB-26) y T47D (HTB-133), frente a una línea

## Materiales y métodos

celular epitelial no tumorigénica procedente de una enfermedad fibrocística mamaria: MCF10A (CRL10317) (Tabla 4). En algunos experimentos, como validación, se ha usado la línea celular HT29 (HTB-38) derivada de un adenocarcinoma colorrectal.

Las líneas MCF7 y T47D fueron mantenidas en RPMI1640 (Instituto Memorial *Roswell Park*) (GIBCO), las líneas MDA-MB 231 y HT29 fueron mantenidas en medio DMEM (Medio *Eagle* modificado por Dulbecco) (GIBCO) y la línea MCF10A fue mantenida en DMEM-F12 (GIBCO) (Medio *Eagle* modificado por Dulbecco, Ham's F12 en proporción v/v 1:1).

Los medios de cultivo RPMI1640 y DMEM fueron suplementados con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Life Technologies), 2 mM de glutamina, 1% de fungizona y 100 U/ml de amikacina (GIBCO). El medio de cultivo DMEM-F12 fue suplementado con suero de ternera neonata (NCS) al 10% (Life Technologies), 2 mM de glutamina, 1% de fungizona y 100 U/ml de amikacina (GIBCO), 10 µg/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF) (Calbiochem), 50 µg/ml de hidrocortisona, 2,5 mg/ml de insulina y 100 ng/ml de toxina colérica (Sigma-Aldrich).

Las líneas celulares fueron mantenidas en condiciones estándar de cultivo: 95% de humedad, 37°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>.

| Líneas Mama                  |                         |                                                 |                                                 |                                      |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Características              | MCF10A                  | MCF7                                            | T47D                                            | MDA-MB 231                           |
| Subtipo molecular            | Basal B                 | Luminal                                         | Luminal                                         | Basal B                              |
| ER                           | -                       | +                                               | +                                               | -                                    |
| PR                           | -                       | +                                               | +                                               | -                                    |
| HER2                         | -                       | -                                               | -                                               | -                                    |
| TP53                         | Normal                  | Normal                                          | Mutado                                          | Mutado                               |
| Origen de la línea celular   | Enfermedad fibrocística | Efusión pleural de un carcinoma ductal invasivo | Efusión pleural de un carcinoma ductal invasivo | Efusión pleural de un adenocarcinoma |
| Capacidad de generar tumores | No                      | Sí                                              | Sí                                              | Sí                                   |

**Tabla 4. Características de las líneas de mama usadas.** ER: receptor de estrógeno; PR: receptor de progesterona; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico 2; TP53: estatus del gen oncoprotector p53. +: Positivo. -: negativo. Adaptado de (Neve *et al.*, 2006).

## 4.3 Análisis de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad se realizaron sembrando células en 200 µl de medio por pocillo, en placas de 96 pocillos (BD Biosciences), dejándolas en su medio de cultivo estándar. A continuación se les añadió el tratamiento correspondiente durante los diferentes tiempos estudiados.

Para el análisis de viabilidad celular se utilizó un método colorimétrico basado en la reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). El MTT se preparó a una concentración de 5 mg/ml en PBS, y se añadieron 20 µl a cada pocillo. La placa se mantuvo en el incubador durante 3 horas, transcurrido ese tiempo se aspiró el medio y se añadieron 200 µl de DMSO. Tras solubilizar todo el contenido celular y ver que el color era homogéneo, la absorbancia fue determinada a 560 nm en un lector de placas VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices).

## 4.4 Determinación de los parámetros IC<sub>50</sub>, GI<sub>50</sub>, TGI, LC<sub>50</sub>

La respuesta celular a los inhibidores de colina quinasa se ha determinado mediante el cálculo de los siguientes parámetros (Figura 7):

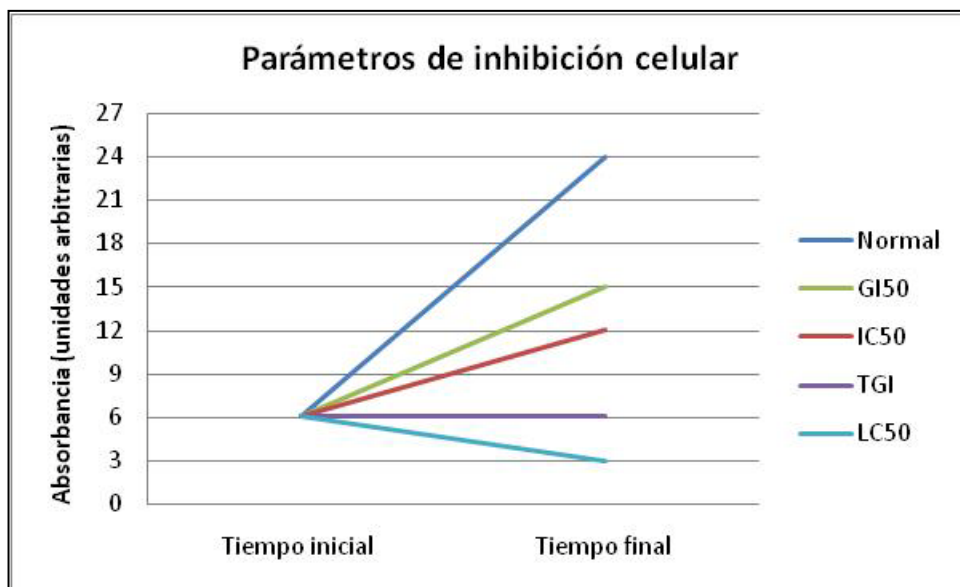
IC<sub>50</sub>, concentración de inhibición 50: concentración de fármaco con la que obtenemos una inhibición celular del 50% en el tiempo final del estudio.

GI<sub>50</sub>, concentración de inhibición del 50% del crecimiento: concentración de fármaco a la que se inhibe el crecimiento celular un 50% en el tiempo final del estudio.

TGI, inhibición total del crecimiento: concentración de fármaco por la que obtenemos una inhibición total del crecimiento celular en el tiempo final del estudio.

LC<sub>50</sub>, concentración letal 50, concentración de fármaco con la que obtenemos una muerte celular del 50% en el tiempo final del estudio.

Para el cálculo de estos parámetros se utilizó el método de MTT (ver apartado 4.3, Análisis de viabilidad celular). Se sembraron células en 200 µl de medio por pocillo en placas de 96 pocillos (BD Biosciences), dejándolas en su medio de cultivo estándar. A continuación se les añadió fármaco a concentraciones crecientes.



**Figura 7. Parámetros de inhibición celular.** Imagen ilustrativa con la significancia biológica de los cuatro parámetros de inhibición celular medidos por la técnica de MTT: GI<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, TGI, LC<sub>50</sub>. Unidades de absorbanza arbitrarias.

### 4.5 Ensayos de citometría de flujo

La distribución del ciclo celular fue determinada mediante tinción del ADN con yoduro de propidio (IP). Las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos durante los tiempos establecidos en cada experimento. Tras centrifugar las células y lavarlas con PBS, se añadieron 50 µl de detergente NP40 para permeabilizar las membranas celulares, después se añadió 1 ml de IP a una concentración de 50 µg/ml conteniendo ARNasa a una concentración de 20 µg/ml.

Para el análisis de la muerte celular se usó anexina V (Southern Biotech, #10038-02), además de IP, distinguiendo así las células apoptóticas tempranas (positivas para anexina V y negativas para IP), apoptóticas tardías (positivas para anexina V y para IP) y las células necróticas (negativas para anexina V y positivas para IP). Las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos durante los tiempos establecidos en cada experimento. Después de lavar las células con PBS, las células fueron resuspendidas en 100 µl de tampón de unión

(HEPES 10 mM pH 7,4; NaCl 140 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM; BSA 0,1%) y se le añadieron 10 µl de anexina V. Las muestras se incubaron durante 15 minutos en oscuridad a 4°C y posteriormente se añadió 380 µl de tampón de unión y 10 µl de IP a 50 µg/ml.

Las células fueron analizadas en un citómetro BD FACScanto II, equipado con 3 láseres.

#### **4.6 Extracción de proteína total procedente de líneas celulares**

Las células, después del tratamiento necesario para cada experimento, se lavaron con PBS. Se obtuvieron extractos proteicos totales a partir de una solución de lisis: NaF 50 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Tritón X-100 0.5% (v/v), deoxicolato sódico 0,5% (p/v), conteniendo los inhibidores de proteasas y fosfatasas: PMSF 0,4 mM, pepstatina A 2 µg/ml y leupeptina 2 µg/ml (todos procedentes de Sigma-Aldrich). El contenido de proteína total se evaluó por el método Bradford (Bio-Rad) utilizando como patrón concentraciones crecientes de BSA (Sigma-Aldrich).

#### **4.7 Separación electroforética de proteínas procedentes de líneas celulares e inmunodetección (Western Blot)**

## Materiales y métodos

Para el análisis de expresión de proteínas específicas, el extracto de proteína total se resolvió en geles de poliacrilamida al 6, 7,5, 10 o 15% dependiendo del tamaño de la proteína en condiciones desnaturizantes y reductoras de SDS (PAGE-SDS) (Bio-Rad Hercules, CA). A continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de un iBlot (Life Technologies, IB3010-32). Las membranas se bloquearon con 5% de leche en polvo desnatada en TTBS (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%), se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo conjugados directamente con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación con los anticuerpos, las membranas fueron lavadas tres veces con TTBS. La visualización de las proteínas se realizó mediante el método de quimioluminiscencia ECL Western Blotting Detection Reagent (Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los anticuerpos utilizados se recogen en la Tabla 5

| Anticuerpo                              | Abreviatura   | Huésped | Dilución usada                       | Peso molecular | Proveedor                        |
|-----------------------------------------|---------------|---------|--------------------------------------|----------------|----------------------------------|
| Colina Quinasa $\alpha$                 | ChoK $\alpha$ | Ratón   | 1:500 en TTBS conteniendo BSA al 5%  | 52 kDa         | Generado por el laboratorio *    |
| Caspasa 3                               |               | Conejo  | 1:1000 en TTBS conteniendo BSA al 5% | 33kDa<br>19kDa | Abcam (ab47131)                  |
| His-Tag                                 |               | Cabra   | 1:1000 en TTBS conteniendo BSA al 5% |                | Santa Cruz Biotechnology (SC803) |
| Fosfo Akt                               | pAkt          | Ratón   | 1:1000 en TTBS conteniendo BSA al 5% | 60 kDa         | Cell Signaling (#4051)           |
| Akt total                               |               | Conejo  | 1:1000 en TTBS conteniendo BSA al 5% | 60 kDa         | Cell Signaling (#4691X)          |
| Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa | GAPDH         | Ratón   | 1:5000 en TTBS conteniendo BSA al 5% | 38 kDa         | Chemicon (MAB374)                |
| Ceramidasa ácida                        | ASAH1         | Ratón   | 1:300 en TTBS conteniendo BSA al 5%  | 13 kDa         | Transduction lab (612302)        |

**Tabla 5. Información sobre los anticuerpos usados.** Información de los anticuerpos usados junto con sus diluciones, peso molecular, huésped y proveedor. \* (Gallego-Ortega *et al.*, 2006).

con las diluciones de anticuerpo usadas, así como la casa comercial de la que fueron obtenidos.

Para la densitometría se utilizó el programa Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad). Los niveles de proteína se normalizaron según la intensidad del control de carga utilizado en cada caso.

## **4.8 Extracción de ARN total procedente de líneas celulares y PCR cuantitativa**

Para la extracción del ARN total de las distintas líneas celulares se partió de  $5 \times 10^5$  células y después del tratamiento requerido en cada experimento, se extrajo el ARN con el kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para comprobar la calidad del ARN extraído, se visualizó en un gel de agarosa al 1% y se midió la contaminación y concentración del ARN en un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000. Se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de ARN para generar el ADNc usando el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems).

La PCR cuantitativa se realizó por triplicado usando 50 ng de ADN en el equipo StepOne Real Time PCR System (Life Technologies). El ARN ribosómico 18S, fue utilizado como control endógeno de la PCR. Las sondas utilizadas se compraron a Life Technologies como *Taqman Gene Expression Assays*.

La cuantificación se realizó por la ecuación del delta delta Ct ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) y de la cuantificación relativa (RQ) detallados en los artículos de Livak y Schmittgen (Livak y Schmittgen, 2001, Schmittgen y Livak, 2008).

## **4.9 Análisis de esfingolípidos**

Para el análisis de ceramidas, esfingomielinas, y de esfingosina, esfinganina y sus formas fosfato, Las células se sembraron en placas P100, después fueron tratadas con los diferentes fármacos y compuestos en los tiempos establecidos en cada experimento. Posteriormente las células se lavaron con PBS y fueron recogidas con una breve tripsinización. Una alícuota del extracto se guardó para la cuantificación de proteínas y el resto se envió para el análisis de esfingolípidos. Los extractos fueron analizados en diferentes centros, los equipos usados, su ubicación y los protocolos seguidos se detallan a continuación:

Protocolo A: Los extractos se enriquecieron con los siguientes patrones internos: N-dodecanoil-esfingosina, N-dodecanoil-glucosilesfingosina, N-dodecanoil-esfingosilfosfocolina y D-eritro-dihidroesfingosina y C17 D-eritro-dihidroesfingosina-1-fosfato; y se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas con analizadores de tiempo de vuelo (UPLC-TOF) (Waters). La columna analítica posee las

siguientes medidas: 100 mm × 2,1 mm diámetro interno, 1,7 micras C8 *Acquity UPLC BEH* (Waters).

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el cromatograma iónico extraído de cada compuesto. El rango dinámico lineal se determinó inyectando mezclas estándar. La identificación positiva de los compuestos se basó en la medición de la masa exacta con un error <5 partes por millón (ppm) y su tiempo de retención en la cromatografía líquida, en comparación con la de un estándar.

Para la cuantificación de las formas fosfato de las bases esfingoides, el análisis de los extractos se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas/masas (LC-MS/MS) con un sistema que consta de una bomba *Waters Alliance 2690 LC* conectado a un espectrómetro de masas *Quattro LC* de triple cuadrupolo de Micromasas. La separación se realizó en una columna *Purospher STAR RP-18* (125 x 2 mm, 5 micras) (Merck). La detección MS/MS se realizó con una interfaz de electropulverización operando en el modo de iones positivos. Una descripción detallada del protocolo seguido ha sido publicado previamente (Canals *et al.*, 2009).

Protocolo B: Los extractos se enriquecieron con los siguientes patrones internos: esfingosina C17, esfingosina-fosfato C17, C17 ceramida 16:0, C17 ceramida 18:0, 18c esfingomielina 6:0, y 18c esfingomielina 17:0. Después de la extracción de lípidos, se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Phenomenex), acoplado a un espectrómetro triple cuadrupolo equipado con una fuente de iones por electroespray (Parker Hannifin Corp). La columna analítica es una columna BDS hypersil C8, con unas medidas 150 mm x 3,2 mm; 3 micras de partículas obtenida de Phenomenex.

La cuantificación de masa se realizó en base a las curvas generadas por las muestras estándares usadas para la calibración.

Una descripción detallada del protocolo seguido ha sido publicado previamente (Bielawski *et al.*, 2006).

### **4.10 Análisis de fosfolípidos**

Las células se sembraron en placas P100, después, las células fueron tratadas con los diferentes fármacos y compuestos en los tiempos establecidos en cada experimento.



Posteriormente las células se lavaron con PBS y recogidas con una breve tripsinización. Las células se homogenizaron en una solución de HCl/CH<sub>3</sub>OH (1:8, v/v), 200 mg/ml del antioxidante 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, y se añadieron los estándares lipídicos. Las fracciones orgánicas se evaporaron y reconstituyeron en una solución CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>OH (90:10:1.25, v/v/v). Los fosfolípidos se analizaron por espectrometría de masas (ESI-MS/MS) en un espectrómetro de cuadrupolo híbrido de trampa de iones (Sistema 4000 QTRAP, Applied Biosystems) (Rysman *et al.*, 2010).

### **4.11 Estudios de resonancia magnética nuclear**

Para los experimentos de RMN, se sembraron células por duplicado o triplicado para cada tratamiento. Tras 16-18 horas se cambió el medio de cultivo por medio fresco con los inhibidores de colina quinasa y se mantuvo durante 24 horas.

Después del tiempo del tratamiento, se lavaron las células con NaCl 0,9 M y se levantaron sin tripsinización, usando un rascador con 1,5 ml de metanol, que se recogió en un tubo de vidrio, a esta mezcla se añadieron 1,5 ml de cloroformo y 1,5 ml de agua. La solución final de MetOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1:1; v/v/v), se centrifugó durante 30 minutos en frío a 2000 rpm.

A la fase acuosa o polar se le añadió agua hasta los 10 ml. Se lavó la fracción con Chelex 100 (C7901-25G) y se congeló a -80°C hasta su procesamiento.

Los espectros de RMN de alta resolución se registraron en un espectrómetro Bruker Avance operando a 16,4 Teslas (frecuencia del protón de 700 MHz) a 293 K usando sondas TXI o QXi con capacidad de pulsos de gradiente de campo, y equipado con un cambiador de muestras BACS120.

Los espectros de RMN de protón se registraron utilizando una secuencia de pulso NOESY (noesygppr1d en la nomenclatura de la compañía Bruker) empleando gradientes de campo durante 10 milisegundos durante el tiempo de mezcla. Se acumularon de 128 a 512 FIDs (*Free Induction Decays*).

Los desplazamientos químicos de protón se referenciaron en relación a las señales de un estándar interno, TMSP (0.00/0.00 ppm).

Con el fin de normalizar la cantidad variable de células en cada placa, la señal total de cada espectro de RMN (calculado como la suma de todas las regiones de integración,

exceptuando la señal del TMS) de cada muestra se tomaron en cuenta. Las muestras con una cantidad total de señal menor se ajustaron con el factor de corrección correspondiente para que coincidiesen con la muestra más concentrada en cada serie. Los valores del desplazamiento químico se presentan en ppm.

### **4.12 Marcaje específico de SM mediante la unión de lisenina**

Venus-lisenina es una proteína de fusión entre la proteína fluorescente venus, que es un derivado de la proteína GFP que emite fluorescencia a la misma longitud de onda que ésta, lisenina, una toxina aislada del gusano *Eisenia foetida* que se une a esfingomielina creando poros en la membrana plasmática produciendo hemólisis y el marcador His-Tag (seis residuos de histidina juntos). El resultado de esta fusión es una proteína que se une específicamente a esfingomielina y que es fluorescente sin ser tóxica para la célula.

El vector con la proteína de fusión venus-lisenina (donado por el grupo de investigación del Dr. Kobayashi al grupo del Dr. Hannun), es un vector PqE3 (Yamaji *et al.*, 1998, Canals *et al.*, 2010).

El protocolo para la purificación de esta proteína de fusión fue el siguiente:

Se transformaron bacterias BL21 con el vector venus-lisenina con resistencia a ampicilina. De las colonias crecidas se picaron 5 colonias y se crecieron en un pre-inóculo de 100 ml de medio de Luria-Bertani (LB).

Al día siguiente se diluyó el pre-inóculo hasta una densidad óptica de 0,05 a 600 nm, en 6 litros de un medio de cultivo altamente rico (*Terrific Broth*) suplementado con ampicilina y se dejó crecer en agitación (250 rpm) a 37 °C, hasta una densidad óptica de 1,5 a 600 nm. La expresión de la proteína de fusión fue inducida con IPTG 1mM (Sigma-Aldrich) durante toda la noche a 37°C en agitación a 250 rpm.

Las bacterias se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 300 ml de buffer de lisis (imidazol 60 mM pH 7.5, Tris HCl pH 7.5, NaCl 100 mM, glicerol 5%) y se sonicó 10 min a 85% de potencia del sonicador en pulsos de 2 segundos con dos segundos de diferencia, todo ello en frío.

Se centrifugó 1 hora a 22.000 rpm a 4°C para eliminar los cuerpos de inclusión y se purificó la muestra mediante cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC).

Las fracciones recogidas en la purificación se comprobaron por Western Blot identificando los 6 residuos de histidina (Figura 8) donde sólo las fracciones 2 y 3 contenían lisenina que una vez cambiado el buffer de disolución fue usado en células.

### **4.13 Análisis de especies reactivas de oxígeno por microscopía *in vivo***

La detección de la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue llevada a cabo mediante la tinción con diclorofluoresceína (DCF), que es un fluoróforo que reacciona con las ROS, emitiendo a 488 nm. Para estos experimentos de microscopía *in vivo* se sembraron células MCF7 y MCF10A en placas de 6 pocillos. El medio se cambió por medio fresco con los inhibidores de colina quinasa durante el tiempo establecido en cada experimento.

Previo a la visualización de las células, éstas se pretrataron durante 1 hora con el fluoróforo DCF (Sigma-Aldrich, #35845) 10  $\mu$ M en PBS. Tras este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS, se añadió medio convencional y se visualizaron en el microscopio Cell Observer donde se fotografiaron durante 6 horas tomando fotos cada media hora.

### **4.14 Estudio de la localización intracelular del factor inductor de apoptosis por microscopía confocal**

La localización del factor de inducción de apoptosis (AIF) fue determinada mediante tinción con un anticuerpo específico en ensayos de microscopía confocal. Para ello, se sembraron células MCF7 y de MDA-MB 231 en placas de 24 pocillos en las que se pusieron previamente laminillas cubreobjetos (Marlenfeld GmbH & Co.KG, #01-115-00). Se cambió el medio por medio fresco con los inhibidores de colina quinasa, después de este tiempo se prepararon las células para la inmunofluorescencia.

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (Merck KGaA, #UN2209) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se permeabilizaron con una solución del 0,1% de tritón X-100 en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se hizo el bloqueo con una solución de BSA al 3% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras el bloqueo se incubó con el anticuerpo primario (Cell Signaling, #4642) a una dilución 1:100 en PBS conteniendo BSA al 3% durante toda la noche a 4 °C. Como anticuerpo

secundario se usó un anticuerpo contra conejo marcado con Alexa fluor 488 (Molecular Probes, Life Technologies, A11006) 1:500 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se marcaron los núcleos con DAPI (Molecular Probes, Life Technologies, D1306) a una dilución 1:500 durante 2 minutos. Finalmente las laminillas se montaron en portaobjetos con una gota de Prolong (Molecular Probes, Life Technologies, P36930) y se guardaron las muestras durante una noche mantenidas en la oscuridad a temperatura ambiente, después se mantuvieron hasta su visualización en frío y en la oscuridad.

### **4.15 Ensayo de actividad de las caspasas 3/7**

Para el ensayo de actividad de las caspasas 3/7 se usó un kit fluorimétrico (R&D Systems, #BF1100). Células MCF7 y HT29 fueron tratadas con los inhibidores de colina quinasa y procesadas según las indicaciones del fabricante. La actividad caspasa se midió por fluorometría con una longitud de onda de excitación de 400 nm y una longitud de emisión de absorción de 505 nm en lector de placas SpectraMax Plus 384 Absorbance Microplate Reader (Molecular Devices).

### **4.16 Análisis estadístico**

Las comparaciones de medias entre variables normales se realizaron utilizando el test de t de Student. Este test se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación típica en lugar del valor real. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Microsoft Office Excel 2007.

***BIBLIOGRAFÍA***

---



---

---

## 5 Bibliografía

Adan-Gokbulut, A., Kartal-Yandim, M., Iskender, G. & Baran, Y. 2013. Novel agents targeting bioactive sphingolipids for the treatment of cancer. *Curr Med Chem*, 20, 108-122.

Ahn, E. H. & Schroeder, J. J. 2006. Sphinganine causes early activation of JNK and p38 MAPK and inhibition of AKT activation in HT-29 human colon cancer cells. *Anticancer Res*, 26, 121-127.

Ahn, E. H. & Schroeder, J. J. 2010. Induction of apoptosis by sphingosine, sphinganine, and C(2)-ceramide in human colon cancer cells, but not by C(2)-dihydroceramide. *Anticancer Res*, 30, 2881-2884.

Al-Saffar, N. M., Troy, H., Ramirez De Molina, A., Jackson, L. E., Madhu, B., Griffiths, J. R., Leach, M. O., Workman, P., Lacal, J. C., Judson, I. R. & Chung, Y. L. 2006. Noninvasive magnetic resonance spectroscopic pharmacodynamic markers of the choline kinase inhibitor MN58b in human carcinoma models. *Cancer Res*, 66, 427-434.

Alesse, E., Zazzeroni, F., Angelucci, A., Giannini, G., Di Marcotullio, L. & Gulino, A. 1998. The growth arrest and downregulation of c-myc transcription induced by ceramide are related events dependent on p21 induction, Rb underphosphorylation and E2F sequestering. *Cell Death Differ*, 5, 381-389.

Almendro, V. & Fuster, G. 2011. Heterogeneity of breast cancer: etiology and clinical relevance. *Clin Transl Oncol*, 13, 767-773.

Aoyama, C., Liao, H. & Ishidate, K. 2004. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog Lipid Res*, 43, 266-281.

Aoyama, C., Nakashima, K. & Ishidate, K. 1998. Molecular cloning of mouse choline kinase and choline/ethanolamine kinase: their sequence comparison to the respective rat homologs. *Biochim Biophys Acta*, 1393, 179-185.

# Bibliografia

---

Aoyama, C., Ohtani, A. & Ishidate, K. 2002. Expression and characterization of the active molecular forms of choline/ethanolamine kinase-alpha and -beta in mouse tissues, including carbon tetrachloride-induced liver. *Biochem J*, 363, 777-784.

Apraiz, A., Idkowiak-Baldys, J. K., Boyano, M. D., Perez-Yarza, G., Hannun, Y. A. & Asumendi, A. 2011. Evaluation of bioactive sphingolipids in 4-HPR-resistant leukemia cells. *BMC Cancer*, 11, 477.

Ardail, D., Maalouf, M., Boivin, A., Chapet, O., Bodennec, J., Rousson, R. & Rodriguez-Lafrasse, C. 2009. Diversity and complexity of ceramide generation after exposure of jurkat leukemia cells to irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 73, 1211-1218.

Ardail, D., Popa, I., Bodennec, J., Famy, C., Louisot, P. & Portoukalian, J. 2002. Subcellular distribution and metabolic fate of exogenous ceramides taken up by HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1583, 305-310.

Bandhuvula, P. & Saba, J. D. 2007. Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol Med*, 13, 210-217.

Banez-Coronel, M., Ramirez De Molina, A., Rodriguez-Gonzalez, A., Sarmentero, J., Ramos, M. A., Garcia-Cabezas, M. A., Garcia-Oroz, L. & Lacal, J. C. 2008. Choline kinase alpha depletion selectively kills tumoral cells. *Curr Cancer Drug Targets*, 8, 709-719.

Bartke, N. & Hannun, Y. A. 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S91-96.

Bhakoo, K. K., Williams, S. R., Florian, C. L., Land, H. & Noble, M. D. 1996. Immortalization and transformation are associated with specific alterations in choline metabolism. *Cancer Res*, 56, 4630-4635.

Bielawska, A., Perry, D. K. & Hannun, Y. A. 2001. Determination of ceramides and diglycerides by the diglyceride kinase assay. *Anal Biochem*, 298, 141-150.

Bielawski, J., Szulc, Z. M., Hannun, Y. A. & Bielawska, A. 2006. Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods*, 39, 82-91.



Billah, M. M. & Anthes, J. C. 1990. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J*, 269, 281-291.

Bionda, C., Portoukalian, J., Schmitt, D., Rodriguez-Lafrasse, C. & Ardail, D. 2004. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J*, 382, 527-533.

Blusztajn, J. K., Zeisel, S. H. & Wurtman, R. J. 1979. Synthesis of lecithin (phosphatidylcholine) from phosphatidylethanolamine in bovine brain. *Brain Res*, 179, 319-327.

Boath, A., Graf, C., Lidome, E., Ullrich, T., Nussbaumer, P. & Bornancin, F. 2008. Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. *J Biol Chem*, 283, 8517-8526.

Bourbon, N. A., Yun, J. & Kester, M. 2000. Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J Biol Chem*, 275, 35617-35623.

Bray, F., Mccarron, P. & Parkin, D. M. 2004. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res*, 6, 229-239.

Busaidy, N. L., Farooki, A., Dowlati, A., Perentesis, J. P., Dancey, J. E., Doyle, L. A., Brell, J. M. & Siu, L. L. 2012. Management of metabolic effects associated with anticancer agents targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway. *J Clin Oncol*, 30, 2919-2928.

Campos, J., Del Carmen Nunez, M., Rodriguez, V., Entrena, A., Hernandez-Alcoceba, R., Fernandez, F., Lacal, J. C., Gallo, M. A. & Espinosa, A. 2001. LUMO energy of model compounds of bispyridinium compounds as an index for the inhibition of choline kinase. *Eur J Med Chem*, 36, 215-225.

Campos, J., Nunez, M. C., Rodriguez, V., Gallo, M. A. & Espinosa, A. 2000. QSAR of 1,1'-(1,2-ethylenebisbenzyl)bis(4-substitutedpyridinium) dibromides as choline kinase inhibitors: a different approach for antiproliferative drug design. *Bioorg Med Chem Lett*, 10, 767-770.

# Bibliografia

---

Canals, D., Jenkins, R. W., Roddy, P., Hernandez-Corbacho, M. J., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. 2010. Differential effects of ceramide and sphingosine 1-phosphate on ERM phosphorylation: probing sphingolipid signaling at the outer plasma membrane. *J Biol Chem*, 285, 32476-32485.

Canals, D., Mormeneo, D., Fabrias, G., Llebaria, A., Casas, J. & Delgado, A. 2009. Synthesis and biological properties of Pachastrissamine (jaspine B) and diastereoisomeric jaspines. *Bioorg Med Chem*, 17, 235-241.

Canals, D., Perry, D. M., Jenkins, R. W. & Hannun, Y. A. 2011. Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *Br J Pharmacol*, 163, 694-712.

Cannon, J. G. 1994. Structure-activity aspects of hemicholinium-3 (HC-3) and its analogs and congeners. *Med Res Rev*, 14, 505-531.

Cao, M. D., Dopkens, M., Krishnamachary, B., Vesuna, F., Gadiya, M. M., Lonning, P. E., Bhujwala, Z. M., Gribbestad, I. S. & Glunde, K. 2012. Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5 (GDPD5) expression correlates with malignant choline phospholipid metabolite profiles in human breast cancer. *NMR Biomed*, 25, 1033-1042.

Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. & Kroemer, G. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825-2837.

Cidado, J. & Park, B. H. 2012. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 17, 205-216.

Circu, M. L. & Aw, T. Y. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48, 749-762.

Clem, B. F., Clem, A. L., Yalcin, A., Goswami, U., Arumugam, S., Telang, S., Trent, J. O. & Chesney, J. 2011. A novel small molecule antagonist of choline kinase-alpha that simultaneously suppresses MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene*, 30, 3370-3380.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, C. 2002. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in

30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, 360, 187-195.

Conejo-Garcia, A., Campos, J., Sanchez, R. M., Rodriguez-Gonzalez, A., Lacal, J. C., Gallo, M. A. & Espinosa, A. 2003. Choline kinase inhibitory effect and antiproliferative activity of new 1,1',1''-(benzene-1,3,5-triylmethylene)tris[4-[(disubstituted)amino]pyridinium] tribromides. *Eur J Med Chem*, 38, 109-116.

Cregan, S. P., Dawson, V. L. & Slack, R. S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*, 23, 2785-2796.

Cuadrado, A., Carnero, A., Dolfi, F., Jimenez, B. & Lacal, J. C. 1993. Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene*, 8, 2959-2968.

Cuvillier, O. & Levade, T. 2001. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood*, 98, 2828-2836.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S. & Spiegel, S. 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381, 800-803.

Cuzick, J., Decensi, A., Arun, B., Brown, P. H., Castiglione, M., Dunn, B., Forbes, J. F., Glaus, A., Howell, A., Von Minckwitz, G., Vogel, V. & Zwierzina, H. 2011. Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. *Lancet Oncol*, 12, 496-503.

Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Mumby, M. C., Kamibayashi, C., Bielawska, A. & Hannun, Y. A. 1999. Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem*, 274, 20313-20317.

Chen, C. L., Lin, C. F., Chang, W. T., Huang, W. C., Teng, C. F. & Lin, Y. S. 2008. Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood*, 111, 4365-4374.

# Bibliografía

---

Chua, B. T., Gallego-Ortega, D., Ramirez De Molina, A., Ullrich, A., Lacal, J. C. & Downward, J. 2009. Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by choline kinase in breast carcinoma cells. *Mol Cancer*, 8, 131.

Dbaibo, G. S., Pushkareva, M. Y., Jayadev, S., Schwarz, J. K., Horowitz, J. M., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. 1995. Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1347-1351.

De La Cueva, A., Ramirez De Molina, A., Alvarez-Ayerza, N., Ramos, M. A., Cebrian, A., Del Pulgar, T. G. & Lacal, J. C. 2013. Combined 5-FU and ChoKalpha Inhibitors as a New Alternative Therapy of Colorectal Cancer: Evidence in Human Tumor-Derived Cell Lines and Mouse Xenografts. *PLoS One*, 8, e64961.

Dickson, M. A., Carvajal, R. D., Merrill, A. H., Jr., Gonen, M., Cane, L. M. & Schwartz, G. K. 2011. A phase I clinical trial of safinol in combination with cisplatin in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 17, 2484-2492.

Dimanche-Boitrel, M. T. & Rebillard, A. 2013. Sphingolipids and response to chemotherapy. *Handb Exp Pharmacol*, 73-91.

Edge, S. B. & Compton, C. C. 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17, 1471-1474.

El Bawab, S., Roddy, P., Qian, T., Bielawska, A., Lemasters, J. J. & Hannun, Y. A. 2000. Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem*, 275, 21508-21513.

Erez-Roman, R., Pienik, R. & Futerman, A. H. 2010. Increased ceramide synthase 2 and 6 mRNA levels in breast cancer tissues and correlation with sphingosine kinase expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 391, 219-223.

Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J. A. & Lluch, A. 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38, 698-707.

Fagone, P. & Jackowski, S. 2013. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 523-532.

Fentiman, I. S., Fourquet, A. & Hortobagyi, G. N. 2006. Male breast cancer. *Lancet*, 367, 595-604.

Furuya, S., Mitoma, J., Makino, A. & Hirabayashi, Y. 1998. Ceramide and its interconvertible metabolite sphingosine function as indispensable lipid factors involved in survival and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J Neurochem*, 71, 366-377.

Futerman, A. H. & Hannun, Y. A. 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep*, 5, 777-782.

Gallego-Ortega, D., Gomez Del Pulgar, T., Valdes-Mora, F., Cebrian, A. & Lacal, J. C. 2011. Involvement of human choline kinase alpha and beta in carcinogenesis: a different role in lipid metabolism and biological functions. *Adv Enzyme Regul*, 51, 183-194.

Gallego-Ortega, D., Ramirez De Molina, A., Gutierrez, R., Ramos, M. A., Sarmentero, J., Cejas, P., Nistal, M., Gonzalez Baron, M. & Lacal, J. C. 2006. Generation and characterization of monoclonal antibodies against choline kinase alpha and their potential use as diagnostic tools in cancer. *Int J Oncol*, 29, 335-340.

Gallego-Ortega, D., Ramirez De Molina, A., Ramos, M. A., Valdes-Mora, F., Barderas, M. G., Sarmentero-Estrada, J. & Lacal, J. C. 2009. Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipid metabolism: implications in cancer onset and treatment. *PLoS One*, 4, e7819.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19, 107-120.

Gangoiti, P., Granado, M. H., Alonso, A., Goni, F. M. & Gomez-Munoz, A. 2008a. Implication of ceramide, ceramide 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate in tumorigenesis. *Transl Oncogenomics*, 3, 81-98.

# Bibliografia

---

Gangoiti, P., Granado, M. H., Wang, S. W., Kong, J. Y., Steinbrecher, U. P. & Gomez-Munoz, A. 2008b. Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cell Signal*, 20, 726-736.

Gault, C. R., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol*, 688, 1-23.

Globocan 2008.

Glunde, K., Bhujwalla, Z. M. & Ronen, S. M. 2011. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer*, 11, 835-848.

Glunde, K., Jie, C. & Bhujwalla, Z. M. 2004. Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 4270-4276.

Glunde, K., Raman, V., Mori, N. & Bhujwalla, Z. M. 2005. RNA interference-mediated choline kinase suppression in breast cancer cells induces differentiation and reduces proliferation. *Cancer Res*, 65, 11034-11043.

Gopal, Y. N., Deng, W., Woodman, S. E., Komurov, K., Ram, P., Smith, P. D. & Davies, M. A. 2010. Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer Res*, 70, 8736-8747.

Grosch, S., Schiffmann, S. & Geisslinger, G. 2012. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog Lipid Res*, 51, 50-62.

Gruber, J., See Too, W. C., Wong, M. T., Lavie, A., Mcsorley, T. & Konrad, M. 2012. Balance of human choline kinase isoforms is critical for cell cycle regulation: implications for the development of choline kinase-targeted cancer therapy. *FEBS J*, 279, 1915-1928.

Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S. & Spiegel, S. 2006. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 2016-2026.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.

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

Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. 1995. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci*, 20, 73-77.

Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. 2002. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*, 277, 25847-25850.

Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 139-150.

Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. 2011. Many ceramides. *J Biol Chem*, 286, 27855-27862.

Heinrich, M., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Sandberg, C., Gahr, J., Schwandner, R., Weber, T., Saftig, P., Peters, C., Brunner, J., Kronke, M. & Schutze, S. 1999. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J*, 18, 5252-5263.

Hernandez-Alcoceba, R., Fernandez, F. & Lacal, J. C. 1999. In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery. *Cancer Res*, 59, 3112-3118.

Hernandez-Alcoceba, R., Saniger, L., Campos, J., Nunez, M. C., Khaless, F., Gallo, M. A., Espinosa, A. & Lacal, J. C. 1997. Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene*, 15, 2289-2301.

Hernando, E., Sarmentero-Estrada, J., Koppie, T., Belda-Iniesta, C., Ramirez De Molina, V., Cejas, P., Ozu, C., Le, C., Sanchez, J. J., Gonzalez-Baron, M., Koutcher, J., Cordon-Cardo, C., Bochner, B. H., Lacal, J. C. & Ramirez De Molina, A. 2009. A critical role for choline kinase-alpha in the aggressiveness of bladder carcinomas. *Oncogene*, 28, 2425-2435.

# Bibliografia

---

Hersey, P., Zhang, X. D. & Mhaidat, N. 2008. Overcoming resistance to apoptosis in cancer therapy. *Adv Exp Med Biol*, 615, 105-126.

Holthuis, J. C. & Luberto, C. 2010. Tales and mysteries of the enigmatic sphingomyelin synthase family. *Adv Exp Med Biol*, 688, 72-85.

Hosaka, K., Kodaki, T. & Yamashita, S. 1989. Cloning and characterization of the yeast CKI gene encoding choline kinase and its expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 264, 2053-2059.

Hosaka, K., Tanaka, S., Nikawa, J. & Yamashita, S. 1992. Cloning of a human choline kinase cDNA by complementation of the yeast cki mutation. *FEBS Lett*, 304, 229-232.

Huang, C., Hydo, L. M., Liu, S. & Miller, R. T. 2009. Activation of choline kinase by extracellular  $Ca^{2+}$  is  $Ca^{2+}$ -sensing receptor,  $\alpha_{12}$  and Rho-dependent in breast cancer cells. *Cell Signal*, 21, 1894-1900.

Hudson, C. S., Knechtel, R. M., Brown, K., Charlton, P. A. & Pollard, J. R. 2013. Kinetic and mechanistic characterisation of Choline Kinase- $\alpha$ . *Biochim Biophys Acta*, 1834, 1107-1116.

Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S. & Nakamura, S. 2003. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J Biol Chem*, 278, 46832-46839.

Instituto Nacional De Estadística, I. 2010.

Iorio, E., Mezzanzanica, D., Alberti, P., Spadaro, F., Ramoni, C., D'ascenzo, S., Millimaggi, D., Pavan, A., Dolo, V., Canevari, S. & Podo, F. 2005. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res*, 65, 9369-9376.

Iorio, E., Ricci, A., Bagnoli, M., Pisanu, M. E., Castellano, G., Di Vito, M., Venturini, E., Glunde, K., Bhujwalla, Z. M., Mezzanzanica, D., Canevari, S. & Podo, F. 2010. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 70, 2126-2135.



Jenkins, R. W., Canals, D. & Hannun, Y. A. 2009. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal*, 21, 836-846.

Ji, L., Zhang, G., Uematsu, S., Akahori, Y. & Hirabayashi, Y. 1995. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Lett*, 358, 211-214.

Kartal Yandim, M., Apohan, E. & Baran, Y. 2013. Therapeutic potential of targeting ceramide/glucosylceramide pathway in cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71, 13-20.

Kennedy, E. P. 1957. Metabolism of lipides. *Annu Rev Biochem*, 26, 119-148.

Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J. & Kroemer, G. 2011. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 221-237.

Kim, S. H., Juhn, Y. S. & Song, Y. S. 2007. Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1095, 82-89.

Koch, J., Gartner, S., Li, C. M., Quintern, L. E., Bernardo, K., Levrant, O., Schnabel, D., Desnick, R. J., Schuchman, E. H. & Sandhoff, K. 1996. Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification Of the first molecular lesion causing Farber disease. *J Biol Chem*, 271, 33110-33115.

Koybasi, S., Senkal, C. E., Sundararaj, K., Spassieva, S., Bielawski, J., Osta, W., Day, T. A., Jiang, J. C., Jazwinski, S. M., Hannun, Y. A., Obeid, L. M. & Ogretmen, B. 2004. Defects in cell growth regulation by C18:0-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas. *J Biol Chem*, 279, 44311-44319.

Kravec, J. M., Li, L., Szulc, Z. M., Bielawski, J., Ogretmen, B., Hannun, Y. A., Obeid, L. M. & Bielawska, A. 2007. Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 282, 16718-16728.

Krishnamachary, B., Glunde, K., Wildes, F., Mori, N., Takagi, T., Raman, V. & Bhujwala, Z. M. 2009. Noninvasive detection of lentiviral-mediated choline kinase targeting in a human breast cancer xenograft. *Cancer Res*, 69, 3464-3471.

# Bibliografia

---

Kroemer, G. & Martin, S. J. 2005. Caspase-independent cell death. *Nat Med*, 11, 725-730.

Kurokawa, H., Nishio, K., Fukumoto, H., Tomonari, A., Suzuki, T. & Saijo, N. 1999. Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncol Rep*, 6, 33-37.

Kwee, S. A., Hernandez, B., Chan, O. & Wong, L. 2012. Choline kinase alpha and hexokinase-2 protein expression in hepatocellular carcinoma: association with survival. *PLoS One*, 7, e46591.

Lacal, J. C. 1990. Diacylglycerol production in *Xenopus laevis* oocytes after microinjection of p21ras proteins is a consequence of activation of phosphatidylcholine metabolism. *Mol Cell Biol*, 10, 333-340.

Lacal, J. C. 2001. Choline kinase: a novel target for antitumor drugs. *IDrugs*, 4, 419-426.

Lacal, J. C., Moscat, J. & Aaronson, S. A. 1987. Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-ras oncogene. *Nature*, 330, 269-272.

Lagarde, M., Sicard, B., Guichardant, M., Felisi, O. & Dechavanne, M. 1984. Fatty acid composition in native and cultured human endothelial cells. *In Vitro*, 20, 33-37.

Lee, J. Y., Leonhardt, L. G. & Obeid, L. M. 1998. Cell-cycle-dependent changes in ceramide levels preceding retinoblastoma protein dephosphorylation in G2/M. *Biochem J*, 334 ( Pt 2), 457-461.

Levy, M. & Futerman, A. H. 2010. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*, 62, 347-356.

Liu, H., Toman, R. E., Goparaju, S. K., Maceyka, M., Nava, V. E., Sankala, H., Payne, S. G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S. & Spiegel, S. 2003. Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J Biol Chem*, 278, 40330-40336.

Liu, Y. Y., Hill, R. A. & Li, Y. T. 2013. Ceramide glycosylation catalyzed by glucosylceramide synthase and cancer drug resistance. *Adv Cancer Res*, 117, 59-89.

Liu, Y. Y., Patwardhan, G. A., Xie, P., Gu, X., Giuliano, A. E. & Cabot, M. C. 2011. Glucosylceramide synthase, a factor in modulating drug resistance, is overexpressed in metastatic breast carcinoma. *Int J Oncol*, 39, 425-431.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*, 25, 402-408.

Long, J. S., Edwards, J., Watson, C., Tovey, S., Mair, K. M., Schiff, R., Natarajan, V., Pyne, N. J. & Pyne, S. 2010. Sphingosine kinase 1 induces tolerance to human epidermal growth factor receptor 2 and prevents formation of a migratory phenotype in response to sphingosine 1-phosphate in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol Cell Biol*, 30, 3827-3841.

Maceyka, M., Harikumar, K. B., Milstien, S. & Spiegel, S. 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol*, 22, 50-60.

Mahdy, A. E., Cheng, J. C., Li, J., Elojeimy, S., Meacham, W. D., Turner, L. S., Bai, A., Gault, C. R., Mcpherson, A. S., Garcia, N., Beckham, T. H., Saad, A., Bielawska, A., Bielawski, J., Hannun, Y. A., Keane, T. E., Taha, M. I., Hammouda, H. M., Norris, J. S. & Liu, X. 2009. Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Mol Ther*, 17, 430-438.

Manchon, P., Borrás, J. M., Ferro, T. & Espinas, J. A. 2010. Breast Cancer OncoGuia. *Clin Transl Oncol*, 12, 113-138.

Mao, C. & Obeid, L. M. 2008. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*, 1781, 424-434.

Mao, C., Xu, R., Szulc, Z. M., Bielawska, A., Galadari, S. H. & Obeid, L. M. 2001. Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem*, 276, 26577-26588.

Marchesini, N. & Hannun, Y. A. 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol*, 82, 27-44.

# Bibliografia

---

Merrill, A. H., Jr. 2002. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem*, 277, 25843-25846.

Mimeault, M. 2002. New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer. *FEBS Lett*, 530, 9-16.

Miyake, T. & Parsons, S. J. 2012. Functional interactions between Choline kinase alpha, epidermal growth factor receptor and c-Src in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*, 31, 1431-1441.

Morad, S. A. & Cabot, M. C. 2013. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 13, 51-65.

Morad, S. A., Madigan, J. P., Levin, J. C., Abdelmageed, N., Karimi, R., Rosenberg, D. W., Kester, M., Shanmugavelandy, S. S. & Cabot, M. C. 2013. Tamoxifen magnifies therapeutic impact of ceramide in human colorectal cancer cells independent of p53. *Biochem Pharmacol*, 85, 1057-1065.

Morales, A., Lee, H., Goni, F. M., Kolesnick, R. & Fernandez-Checa, J. C. 2007. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*, 12, 923-939.

Mori, N., Glunde, K., Takagi, T., Raman, V. & Bhujwalla, Z. M. 2007. Choline kinase down-regulation increases the effect of 5-fluorouracil in breast cancer cells. *Cancer Res*, 67, 11284-11290.

Morse, D. L., Carroll, D., Day, S., Gray, H., Sadarangani, P., Murthi, S., Job, C., Baggett, B., Raghunand, N. & Gillies, R. J. 2009. Characterization of breast cancers and therapy response by MRS and quantitative gene expression profiling in the choline pathway. *NMR Biomed*, 22, 114-127.

Mullen, T. D., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. 2012. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J*, 441, 789-802.

Mullen, T. D., Jenkins, R. W., Clarke, C. J., Bielawski, J., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. 2011. Ceramide synthase-dependent ceramide generation and programmed cell death:

involvement of salvage pathway in regulating postmitochondrial events. *J Biol Chem*, 286, 15929-15942.

Nakagami, K., Uchida, T., Ohwada, S., Koibuchi, Y., Suda, Y., Sekine, T. & Morishita, Y. 1999. Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Jpn J Cancer Res*, 90, 419-424.

Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., Devries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W. L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., Waldman, F. M., McCormick, F., Dickson, R. B., Johnson, M. D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A. & Gray, J. W. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10, 515-527.

Nimmagadda, S., Glunde, K., Pomper, M. G. & Bhujwalla, Z. M. 2009. Pharmacodynamic markers for choline kinase down-regulation in breast cancer cells. *Neoplasia*, 11, 477-484.

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

Obeid, L. M., Linaudic, C. M., Karolak, L. A. & Hannun, Y. A. 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 259, 1769-1771.

Ogretmen, B. 2006. Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Lett*, 580, 5467-5476.

Ogretmen, B. & Hannun, Y. A. 2004. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*, 4, 604-616.

Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S. & Spiegel, S. 1999. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol*, 147, 545-558.

Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Marron, J. S., Nobel, A. B., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., Perou, C. M. & Bernard, P. S. 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 27, 1160-1167.

# Bibliografia

---

Pelech, S. L. & Vance, D. E. 1984. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 779, 217-251.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. & Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-752.

Pettus, B. J., Kitatani, K., Chalfant, C. E., Taha, T. A., Kawamori, T., Bielawski, J., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. 2005. The coordination of prostaglandin E2 production by sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate. *Mol Pharmacol*, 68, 330-335.

Pink, J. J., Wuerzberger-Davis, S., Tagliarino, C., Planchon, S. M., Yang, X., Froelich, C. J. & Boothman, D. A. 2000. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during beta-lapachone-mediated apoptosis. *Exp Cell Res*, 255, 144-155.

Polyak, K. 2007. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*, 117, 3155-3163.

Ponnusamy, S., Meyers-Needham, M., Senkal, C. E., Saddoughi, S. A., Sentelle, D., Selvam, S. P., Salas, A. & Ogretmen, B. 2010. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol*, 6, 1603-1624.

Pruett, S. T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C. A., Sullards, M. C., Liotta, D. C. & Merrill, A. H., Jr. 2008. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J Lipid Res*, 49, 1621-1639.

Pyne, N. J., Long, J. S., Lee, S. C., Loveridge, C., Gillies, L. & Pyne, S. 2009. New aspects of sphingosine 1-phosphate signaling in mammalian cells. *Adv Enzyme Regul*, 49, 214-221.

Pyne, N. J. & Pyne, S. 2010. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer*, 10, 489-503.

Pyne, N. J., Tonelli, F., Lim, K. G., Long, J. S., Edwards, J. & Pyne, S. 2012. Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer. *Biochem Soc Trans*, 40, 94-100.

Ramirez De Molina, A., Banez-Coronel, M., Gutierrez, R., Rodriguez-Gonzalez, A., Olmeda, D., Megias, D. & Lacal, J. C. 2004. Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression. *Cancer Res*, 64, 6732-6739.

Ramirez De Molina, A., De La Cueva, A., Machado-Pinilla, R., Rodriguez-Fanjul, V., Del Pulgar, T. G., Cebrian, A., Perona, R. & Lacal, J. C. 2012. Acid ceramidase as a chemotherapeutic target to overcome resistance to the antitumoral effect of choline kinase alpha inhibition. *Curr Cancer Drug Targets*, 12, 617-624.

Ramirez De Molina, A., Gallego-Ortega, D., Sarmentero-Estrada, J., Lagares, D., Gomez Del Pulgar, T., Bandres, E., Garcia-Foncillas, J. & Lacal, J. C. 2008. Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: implications in cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1753-1763.

Ramirez De Molina, A., Gallego-Ortega, D., Sarmentero, J., Banez-Coronel, M., Martin-Cantalejo, Y. & Lacal, J. C. 2005. Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer Res*, 65, 5647-5653.

Ramirez De Molina, A., Gutierrez, R., Ramos, M. A., Silva, J. M., Silva, J., Bonilla, F., Sanchez, J. J. & Lacal, J. C. 2002a. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene*, 21, 4317-4322.

Ramirez De Molina, A., Rodriguez-Gonzalez, A., Gutierrez, R., Martinez-Pineiro, L., Sanchez, J., Bonilla, F., Rosell, R. & Lacal, J. 2002b. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 580-583.

Ramirez De Molina, A., Rodriguez-Gonzalez, A., Penalva, V., Lucas, L. & Lacal, J. C. 2001. Inhibition of ChoK is an efficient antitumor strategy for Harvey-, Kirsten-, and N-ras-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285, 873-879.

Ramirez De Molina, A., Sarmentero-Estrada, J., Belda-Iniesta, C., Taron, M., Ramirez De Molina, V., Cejas, P., Skrzypski, M., Gallego-Ortega, D., De Castro, J., Casado, E., Garcia-Cabezas, M. A., Sanchez, J. J., Nistal, M., Rosell, R., Gonzalez-Baron, M. & Lacal, J. C. 2007. Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol*, 8, 889-897.

# Bibliografía

---

Roberts, S. J., Stewart, A. J., Schmid, R., Blindauer, C. A., Bond, S. R., Sadler, P. J. & Farquharson, C. 2005. Probing the substrate specificities of human PHOSPHO1 and PHOSPHO2. *Biochim Biophys Acta*, 1752, 73-82.

Rodriguez-Gonzalez, A., Ramirez De Molina, A., Banez-Coronel, M., Megias, D. & Lacal, J. C. 2005. Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial independent mechanism. *Int J Oncol*, 26, 999-1008.

Rodriguez-Gonzalez, A., Ramirez De Molina, A., Fernandez, F. & Lacal, J. C. 2004. Choline kinase inhibition induces the increase in ceramides resulting in a highly specific and selective cytotoxic antitumoral strategy as a potential mechanism of action. *Oncogene*, 23, 8247-8259.

Rodriguez-Gonzalez, A., Ramirez De Molina, A., Fernandez, F., Ramos, M. A., Del Carmen Nunez, M., Campos, J. & Lacal, J. C. 2003. Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene*, 22, 8803-8812.

Rosen, H. & Goetzl, E. J. 2005. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol*, 5, 560-570.

Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Van Veldhoven, P. P., Waltregny, D., Daniels, V. W., Machiels, J., Vanderhoydonc, F., Smans, K., Waelkens, E., Verhoeven, G. & Swinnen, J. V. 2010. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res*, 70, 8117-8126.

Saddoughi, S. A. & Ogretmen, B. 2013. Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Adv Cancer Res*, 117, 37-58.

Sahun-Roncero, M., Rubio-Ruiz, B., Saladino, G., Conejo-Garcia, A., Espinosa, A., Velazquez-Campoy, A., Gervasio, F. L., Entrena, A. & Hurtado-Guerrero, R. 2013. The Mechanism of Allosteric Coupling in Choline Kinase alpha1 Revealed by the Action of a Rationally Designed Inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52, 4582-4586.

Sanchez-Martin, R., Campos, J. M., Conejo-Garcia, A., Cruz-Lopez, O., Banez-Coronel, M., Rodriguez-Gonzalez, A., Gallo, M. A., Lacal, J. C. & Espinosa, A. 2005. Symmetrical bis-quinolinium compounds: new human choline kinase inhibitors with antiproliferative activity against the HT-29 cell line. *J Med Chem*, 48, 3354-3363.



Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R. & Codogno, P. 2004. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem*, 279, 18384-18391.

Schiffmann, S., Sandner, J., Birod, K., Wobst, I., Angioni, C., Ruckhaberle, E., Kaufmann, M., Ackermann, H., Lotsch, J., Schmidt, H., Geisslinger, G. & Grosch, S. 2009. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis*, 30, 745-752.

Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-1108.

Schuike, I. & Daum, G. 2009. Phosphatidylserine decarboxylases, key enzymes of lipid metabolism. *IUBMB Life*, 61, 151-162.

Senkal, C. E., Ponnusamy, S., Bielawski, J., Hannun, Y. A. & Ogretmen, B. 2010. Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. *FASEB J*, 24, 296-308.

Senkal, C. E., Ponnusamy, S., Manevich, Y., Meyers-Needham, M., Saddoughi, S. A., Mukhopadhyay, A., Dent, P., Bielawski, J. & Ogretmen, B. 2011. Alteration of ceramide synthase 6/C16-ceramide induces activating transcription factor 6-mediated endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis via perturbation of cellular Ca<sup>2+</sup> and ER/Golgi membrane network. *J Biol Chem*, 286, 42446-42458.

Senkal, C. E., Ponnusamy, S., Rossi, M. J., Bialewski, J., Sinha, D., Jiang, J. C., Jazwinski, S. M., Hannun, Y. A. & Ogretmen, B. 2007. Role of human longevity assurance gene 1 and C18-ceramide in chemotherapy-induced cell death in human head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther*, 6, 712-722.

Shah, T., Wildes, F., Penet, M. F., Winnard, P. T., Jr., Glunde, K., Artemov, D., Ackerstaff, E., Gimi, B., Kakkad, S., Raman, V. & Bhujwalla, Z. M. 2010. Choline kinase overexpression increases invasiveness and drug resistance of human breast cancer cells. *NMR Biomed*, 23, 633-642.

Sietsma, H., Veldman, R. J. & Kok, J. W. 2001. The involvement of sphingolipids in multidrug resistance. *J Membr Biol*, 181, 153-162.

# Bibliografia

---

Spiegel, S. & Milstien, S. 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 397-407.

Sumitomo, M., Ohba, M., Asakuma, J., Asano, T., Kuroki, T. & Hayakawa, M. 2002. Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J Clin Invest*, 109, 827-836.

Tafesse, F. G., Ternes, P. & Holthuis, J. C. 2006. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem*, 281, 29421-29425.

Taha, T. A., Mullen, T. D. & Obeid, L. M. 2006. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 2027-2036.

Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Anil Kumar, K. & Reddanna, P. 2013. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front Oncol*, 3, 165.

Van Echten-Deckert, G. & Walter, J. 2012. Sphingolipids: critical players in Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res*, 51, 378-393.

Vance, D. E. 2013. Physiological roles of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 626-632.

Vargo-Gogola, T. & Rosen, J. M. 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer*, 7, 659-672.

Venable, M. E., Lee, J. Y., Smyth, M. J., Bielawska, A. & Obeid, L. M. 1995. Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem*, 270, 30701-30708.

Villani, M., Subathra, M., Im, Y. B., Choi, Y., Signorelli, P., Del Poeta, M. & Luberto, C. 2008. Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *Biochem J*, 414, 31-41.

Visentin, B., Vekich, J. A., Sibbald, B. J., Cavalli, A. L., Moreno, K. M., Matteo, R. G., Garland, W. A., Lu, Y., Yu, S., Hall, H. S., Kundra, V., Mills, G. B. & Sabbadini, R. A. 2006. Validation of

an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell*, 9, 225-238.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr. & Kinzler, K. W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*, 339, 1546-1558.

Weigelt, B., Baehner, F. L. & Reis-Filho, J. S. 2010a. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*, 220, 263-280.

Weigelt, B., Geyer, F. C. & Reis-Filho, J. S. 2010b. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*, 4, 192-208.

Wittenberg, J. & Kornberg, A. 1953. Choline phosphokinase. *J Biol Chem*, 202, 431-444.

Wu, G., Aoyama, C., Young, S. G. & Vance, D. E. 2008. Early embryonic lethality caused by disruption of the gene for choline kinase alpha, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *J Biol Chem*, 283, 1456-1462.

Wu, G., Sher, R. B., Cox, G. A. & Vance, D. E. 2010. Differential expression of choline kinase isoforms in skeletal muscle explains the phenotypic variability in the rostrocaudal muscular dystrophy mouse. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 446-454.

Yalcin, A., Clem, B., Makoni, S., Clem, A., Nelson, K., Thornburg, J., Siow, D., Lane, A. N., Brock, S. E., Goswami, U., Eaton, J. W., Telang, S. & Chesney, J. 2010. Selective inhibition of choline kinase simultaneously attenuates MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene*, 29, 139-149.

Yamaji, A., Sekizawa, Y., Emoto, K., Sakuraba, H., Inoue, K., Kobayashi, H. & Umeda, M. 1998. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J Biol Chem*, 273, 5300-5306.

Yamaji, T., Kumagai, K., Tomishige, N. & Hanada, K. 2008. Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB Life*, 60, 511-518.

# Bibliografia

---

Zeisel, S. H. 1993. Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J*, 7, 551-557.

Zeisel, S. H., Da Costa, K. A., Franklin, P. D., Alexander, E. A., Lamont, J. T., Sheard, N. F. & Beiser, A. 1991. Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J*, 5, 2093-2098.

Zhang, H., Buckley, N. E., Gibson, K. & Spiegel, S. 1990. Sphingosine stimulates cellular proliferation via a protein kinase C-independent pathway. *J Biol Chem*, 265, 76-81.

Zhang, H., Desai, N. N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G. & Spiegel, S. 1991. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol*, 114, 155-167.

Zhang, X. H., Zhao, C. & Ma, Z. A. 2007. The increase of cell-membranous phosphatidylcholines containing polyunsaturated fatty acid residues induces phosphorylation of p53 through activation of ATR. *J Cell Sci*, 120, 4134-4143.

Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X. H., Basu, S., Mcginley, M., Chan-Hui, P. Y., Lichenstein, H. & Kolesnick, R. 1997. Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell*, 89, 63-72.

Zhao, G., Cai, C., Yang, T., Qiu, X., Liao, B., Li, W., Ji, Z., Zhao, J., Zhao, H., Guo, M., Ma, Q., Xiao, C., Fan, Q. & Ma, B. 2013. MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma. *PLoS One*, 8, e53906.

Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J. C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M. C., Cabot, M. & Merrill, A. H., Jr. 2006. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 1864-1884.

***ANEXOS***

---

