



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

# Efecto de las distintas isoformas de SMS en la proliferación tumorigénica

Margalida Rosselló Tortella

**Grado de Bioquímica**

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 43210051C

Trabajo tutelado por Dr. Pablo V. Escribá Ruiz  
Departamento de Biología

Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
		X		X

Palabras clave del trabajo:

Glioma · Terapia lipídica de membrana · Esfingomielina sintasa 1 y 2 · Ácido 2-hidroxioléico · Viabilidad celular



# Contenidos

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. GLIOMAS	3
1.1.1. SEVERIDAD Y PRONÓSTICO	3
1.1.2. GLIOBLASTOMA	4
1.1.3. TRATAMIENTOS ACTUALES Y VISIÓN DE FUTURO	4
1.2. ORGANIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES	5
1.3. TERAPIA LIPÍDICA DE MEMBRANA	6
1.4. ÁCIDO 2-HIDROXIOLEICO	7
1.4.1. INCORPORACIÓN A LAS MEMBRANAS CELULARES	8
1.4.2. ACTIVACIÓN DE LA ESFINGOMIELINA SINTASA	8
1.4.3. TRANSLOCACIÓN DE RAS AL CITOSOL	9
1.4.4. TRANSLOCACIÓN DE PKC A LA MEMBRANA PLASMÁTICA	9
1.4.5. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN LEUCEMIA	9
1.4.6. INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA EN GLIOMA	10
1.5. PAPEL DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN EL FUNCIONAMIENTO CELULAR	10
1.5.1. IMPLICACIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LA SEÑALIZACIÓN CELULAR	10
1.5.2. ESFINGOLÍPIDOS COMO DIANAS TERAPÉUTICAS	12
1.6. ESFINGOMIELINA SINTASA	12
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
3.1. REACTIVOS	17
3.2. CULTIVO CELULAR	17
3.3. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA	17
3.3.1. CONSTRUCCIÓN GÉNICA DE SMS Y PLÁSMIDOS USADOS	18
3.3.2. SISTEMA DE SOBRE-EXPRESIÓN DE SMS	20
3.4. RECOGIDA DE CÉLULAS	20
3.5. CONTAJE CELULAR	21
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>22</b>
4.1. VIABILIDAD CELULAR CON SOBRE-EXPRESIÓN DE SMS1	22
4.2. VIABILIDAD CELULAR CON SOBRE-EXPRESIÓN DE SMS2	22
4.3. CONFIRMACIÓN DE LA SOBRE-EXPRESIÓN	23
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>28</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>29</b>

## Resumen

El glioma maligno es el tumor primario cerebral más común en adultos. A su vez, el glioblastoma es el glioma más agresivo, con una supervivencia media de entre 9 y 12 meses tras su diagnóstico porque todavía no se dispone de un tratamiento efectivo para combatirlo. Por ese motivo se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas para tratar esta enfermedad, como por ejemplo la terapia lipídica de membrana y el ácido 2-hidroxioléico (2OHOA). La mitad de los pacientes de glioma tratados con este fármaco han respondido al tratamiento con la paralización del desarrollo del tumor o incluso su remisión. El mecanismo de acción de este fármaco implica la activación de la enzima esfingomielina sintasa (SMS), que sintetiza esfingomielina y 1,2-diacilglicerol a partir de ceramida y fosfatidilcolina. Esto provoca un aumento del contenido de esfingomielina en las células tumorales y desencadena los cambios moleculares que restablecen la función normal de la célula. La reacción catalizada por la SMS implica la interconversión de moléculas lipídicas relacionadas en la supervivencia celular, la ceramida y el 1,2-diacilglicerol, por lo que esta enzima puede estar implicada en la regulación de la viabilidad celular. En este trabajo se estudia el efecto de la sobre-expresión de la SMS1 y la SMS2 sobre la viabilidad celular en tres líneas celulares procedentes de glioblastoma mediante una transfección transitoria. Se ha visto como la sobre-expresión de SMS1 disminuye significativamente la viabilidad de las células de glioma, por lo que puede resultar beneficiosa para el tratamiento de esta enfermedad. La sobre-expresión de SMS2 tiene efectos diferentes según la línea celular, pudiendo provocar un aumento del número de células o bien no provocar cambios en la viabilidad. La administración de 2OHOA a estas células resultó en una reducción significativa de la viabilidad, independientemente de qué isoforma de SMS sobre-expresan. Estos resultados demuestran que la SMS puede tener un papel relevante en la regulación de la proliferación de células de glioma.

---

*Malignant glioma is the most usual type of primary brain tumor in adults. In turn, glioblastoma is the most aggressive glioma, with a median survival of 9 to 12 months after diagnosis due to the lack of any effective treatment against it. This is the reason why new therapeutic strategies are being developed with the aim to treat this disease, such as membrane lipid therapy and 2-hydroxyoleic acid (2OHOA). Approximately a half of the glioma patients treated with 2OHOA have responded to the treatment with an arrest of tumor growth or remission. The mechanism of action of this drug involves the activation of a protein named sphingomyelin synthase (SMS), which catalyzes the synthesis of sphingomyelin and 1,2-diacylglycerol from ceramide and phosphatidylcholine. This leads to an increase of sphingomyelin mass in tumor cells and triggering the molecular changes that restore normal cell function. SMS may be involved in cell viability regulations as it catalyzes the conversion of two molecules (ceramide and 1,2-diacylglycerol) related to cell survival or death induction. Here, we used a transient transfection to overexpress SMS1 or SMS2 in three human glioblastoma cell lines in order to evaluate their effects in cell viability. On the one hand, we found that overexpression of SMS1 significantly diminished cell viability in all the glioma cell lines analyzed, so it could be beneficial for glioblastoma treatment. On the other hand, overexpression of SMS2 showed different effects on cell viability depending on the cell line since two of them did not experiment any changes in cell survival while the third one significantly increased its viability. Moreover, cells overexpressing SMS1 or SMS2 treated with 2OHOA decreased their viability regardless of the SMS isoform overexpressed. These findings suggest that SMS can play an outstanding role in the regulation of glioma cell proliferation.*

# 1. Introducción

## 1.1. Gliomas

El glioma maligno es el tumor primario del sistema nervioso central más frecuente en adultos [1], representando más del 70% de los casos de tumores cerebrales [2]. Su incidencia media es de 5 nuevos casos anuales por cada 100.000 personas, pudiendo variar según la población estudiada [3].

Los gliomas son un conjunto de tumores neuroepiteliales [4], clasificados por el cirujano Harvey Cushing en astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas, ependimomas u otras neoplasias según su similitud morfológica con las células gliales del sistema nervioso central [1,4,5]. A raíz de la similitud morfológica que ha permitido la clasificación de los gliomas, se pensó que este tipo de tumor se originaba a partir de las células gliales, generándose, por ejemplo, un astrocitoma a partir de un astrocito o un oligodendroglioma a partir de un oligodendrocito. Sin embargo, las células de la glía tienen una capacidad de división muy limitada, por lo que deben adquirir mutaciones inductoras de desdiferenciación y migración para dar lugar a un glioma. El descubrimiento de la presencia de células progenitoras neurales residentes en el sistema nervioso central del adulto, con un elevado potencial de división y migración, abrió la puerta a la sospecha de otro posible origen de los gliomas [1,5].

### 1.1.1. Severidad y pronóstico

La OMS desarrolló una escala del I al IV con la que evaluar la malignidad de un glioma, siendo el grado I el más benigno y el grado IV el más maligno e invasivo [4]. Esta escala se basa en aspectos histológicos del tumor, como son la densidad celular, morfología celular, actividad mitótica, necrosis o angiogénesis, así como también en las alteraciones genéticas que presentan las células tumorales (véase la figura 1) [4,5]. Los gliomas de grado I son benignos y son fácilmente extirpables puesto que no presentan infiltración. Sin embargo, los gliomas de grado II o superior tienen naturaleza invasiva y se infiltran en el tejido circundante, por lo que se denominan gliomas difusos [1,4]. Los gliomas que presentan una morfología celular atípica y capacidad de infiltración se clasifican como grado II, aunque tienden a evolucionar hacia el grado III o IV en menos de 10 años en el 70% de los casos [2,5]. Aquellos tumores que muestran anaplasia y actividad mitótica se clasifican como grado III, y aquellos que presenten necrosis y proliferación microvascular son de grado IV [4,5].

	Low-grade astrocytoma (5–10 years)	Anaplastic astrocytoma (2–3 years)	Glioblastoma (9–12 months)
Proliferation	+/-	++	+++
Invasion	++	++	+++
Angiogenesis	—	—	+++
Necrosis	—	—	+++
Rx responsive	—	++	—

**Figura 1.** Características histológicas que permiten evaluar un glioma para otorgarle un grado de malignidad entre I y IV, según la clasificación de la OMS, así como la supervivencia media esperada por cada glioma según su malignidad desde el momento de su diagnóstico. Extraída de [5].

Cuanto más elevada es la posición de un glioma en la clasificación de la OMS, peor es su pronóstico. Una persona diagnosticada con un glioma de grado II, como un astrocitoma de bajo grado, tienen una

esperanza de vida de entre 5 y 15 años. La esperanza de vida de una persona diagnosticada con un glioma de grado III, como un astrocitoma anaplásico, no supera los 3 años. Los pacientes diagnosticados con un glioma de grado IV, como un glioblastoma, tienen una esperanza de vida inferior a un año [1,5]. Así mismo, los oligodendrogliomas suelen ofrecer un mejor pronóstico y respuesta a las terapias que los astrocitomas, aun compartiendo el mismo grado de malignidad [1].

### **1.1.2. Glioblastoma**

El único glioma clasificado con el grado IV de malignidad es el glioblastoma [2,4]. El estudio histológico de un glioblastoma revela que sus células tienen una morfología similar a astrocitos desdiferenciados con atipia nuclear y con una elevada actividad mitótica además indicios de necrosis y de angiogénesis, por lo que se puede decir que es un tipo de astrocitoma [2,4,5].

Este tipo de tumor puede ser primario o secundario según si se diagnostica *de novo* o si procede de la evolución de un astrocitoma de grado II previamente diagnosticado, respectivamente [2,5]. El glioblastoma primario se diagnostica en pacientes cuya edad media se sitúa en los 60 años y es tres veces más frecuente en hombres. Se trata del glioblastoma más común, pues suma más del 90% de casos de glioblastoma [3]. El glioblastoma secundario es más habitual en pacientes más jóvenes, de 45 años de edad de media, y aparece con mayor frecuencia en mujeres [2], aunque es poco común [3]. Aunque las manifestaciones clínicas de un glioblastoma primario son idénticas a las que presenta un glioblastoma secundario, cosa que los hace indistinguibles a nivel morfológico, diferencias en los perfiles genéticos entre ambos tumores ponen de manifiesto que son entidades independientes [2,5].

El glioblastoma es el glioma más frecuente, ya que es el diagnóstico ofrecido en aproximadamente el 50% de los casos de tumores cerebrales, lo cual equivale aproximadamente a una incidencia de 3 nuevos casos por cada 100.000 habitantes por año [2]. También es el glioma más severo y con pronóstico más reservado, puesto que el tiempo esperado de supervivencia tras el diagnóstico es menor a un año [2,5]. Entre un 17 y un 30% de los pacientes diagnosticados con un glioblastoma sobreviven un año después del diagnóstico, y solamente entre un 3 y un 5% de los pacientes sobreviven dos [2,4].

### **1.1.3. Tratamientos actuales y visión de futuro**

Los dos hechos que determinan la malignidad de muchos gliomas y el fracaso de los tratamientos que se les aplica son su elevada capacidad infiltrativa y una habitual resistencia a los fármacos [1,2,5].

La naturaleza invasiva del glioma provoca que su extirpación quirúrgica completa sea inviable como tratamiento exclusivo en la mayoría de casos, salvo en los gliomas benignos de grado I como el astrocitoma pilocítico. Aunque los avances de la medicina han conseguido que mediante la cirugía se pueda eliminar un 98% del tumor, su difusión impide la resección total y hace que la probabilidad de recidivas sea elevada [5]. Por ello, se intentan combinar procesos quirúrgicos con la administración de quimioterapia y/o radioterapia para tratar este tipo de tumores cerebrales [2,5].

El tratamiento estándar actual para el tratamiento de un glioblastoma consiste en una aproximación quirúrgica para reducir el tamaño del tumor, la aplicación de radioterapia en la zona afectada y la administración del fármaco temozolomida, un agente alquilante que introduce grupos metilo en el DNA de las células del glioblastoma e interfiere en su replicación, dificultando la división celular [2].

Sin embargo, este tratamiento solamente aumenta la esperanza del paciente unos dos meses. Por este motivo, son muchos los laboratorios que dedican sus esfuerzos a entender la biología del glioblastoma para desarrollar nuevos fármacos con los que hacer frente a su crecimiento y fatalidad [1,2].







Actualmente hay una gran variedad de fármacos y distintas estrategias terapéuticas que se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos, pero todavía no se ha conseguido desarrollar ninguna terapia que sea capaz de revertir el tumor para llegar a una curación total [1,2]. Los científicos y neuro-oncólogos no pierden la esperanza, pues está creciendo el conocimiento de la patología molecular de los gliomas y, con ello, el hallazgo de su cura podría estar cada vez más cerca.

## 1.2. Organización de las membranas celulares

Las membranas celulares consisten en una matriz hidrofóbica formada por más de mil tipos distintos de lípidos organizados formando una bicapa a la cual se pueden unir diferentes proteínas y carbohidratos de forma transitoria o permanente [6,7]. Así es como Singer y Nicolson describieron la membrana celular mediante el modelo de mosaico fluido en 1972, el cual sigue siendo aceptado hoy en día aunque con algunas puntualizaciones que se han descubierto en estos 40 años [7].

La distribución de lípidos en las membranas varía según el tipo celular y el orgánulo, incluso puede variar entre diferentes regiones de una misma membrana y entre las dos monocapas, lo que puede tener efectos directos en sus propiedades físico-químicas y en sus funciones específicas [6,8,9].

Se dice que los lípidos de membrana son polimórficos porque pueden organizarse en diferentes estructuras supramoleculares en función de su forma molecular efectiva y propiedades físicas [9,10]. La manera más fácil de ver este polimorfismo lipídico son las fases lamelares y no-lamelares de las membranas lipídicas o su grado de curvatura [9] (véase la tabla 1). La fase normalmente hallada en las membranas celulares es la fase lamelar, es decir la bicapa lipídica clásica formada por lípidos cuya forma molecular es cilíndrica. La fase lamelar puede adoptar distintos grados de ordenación o curvatura según su composición en lípidos y la movilidad de estos, pudiéndose distinguir entre las fases de líquido cristalino ( $L\alpha$ ) o de gel ( $L\beta$ ), entre otras. Por contra, las fases no-lamelares son aquellas en las que algunos lípidos se disponen de una forma que difiere a la bicapa clásica, como por ejemplo formando micelas o fases hexagonales  $H_I$  y  $H_{II}$ , pues su forma molecular efectiva impide su disposición en una estructura plana. Son muy poco habituales en las membranas celulares, y su presencia suele estar relacionadas con funciones o procesos específicos en los que tenga que participar esa región de la membrana, como por ejemplo la fusión de una vesícula a otra membrana [6,9].

Fase	Forma del lípido	Forma de la estructura	Ejemplos de lípidos
Lamelar (L)	 Cilindro		Fosfatidilcolina
No-lamelar hexagonal invertida ( $H_{II}$ )	 Cono		Fosfatidiletanolamina Diacilglicerol
No-lamelar hexagonal ( $H_I$ )	 Cono invertido		Liso-fosfolípidos

**Tabla 1.** Forma efectiva de los lípidos de membrana que conforman las fases lamelares y no-lamelares y el orden en que se disponen. Basada en información de [6,7,10]; figuras extraídas de [10].

Los lípidos de las membranas no se encuentran unidos covalentemente entre ellos, sino que interactúan unos con otros de forma dinámica y específica en base a distintas afinidades para formar diferentes estructuras y agregados con diferentes propiedades físico-químicas llamados microdominios

de membrana, los cuales tienen una composición diferente de las regiones que los flanquean y actúan como plataformas de señalización [6–8]. Los *lipid raft* son un ejemplo de microdominio de membrana rico en esfingomielina y colesterol. Estos lípidos forman una fase lamelar altamente ordenada y compactada (dominio  $l_o$ , del inglés *liquid-ordered*) que se encuentra rodeada de otros fosfolípidos con un elevado grado de desorden ( $l_d$ , del inglés *liquid-disordered* por contraposición, aunque es  $L\alpha$ ) [6,7].

La estructura de la membrana, que depende de la forma y ordenación de los lípidos que la constituyen, es muy importante para la localización y función de las proteínas de membrana [6,8,11]. Es importante conocer cómo se modifica la estructura de la membrana para explicar cómo se regula su función.

### 1.3. Terapia lipídica de membrana

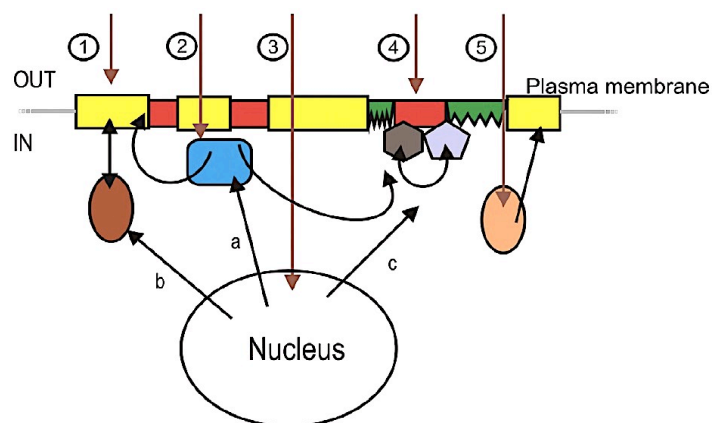
En un primer momento se pensaba que las membranas no eran más que el límite físico que separaba una célula o un orgánulo, actuando los lípidos como un mero soporte físico para las proteínas embebidas en ellas, las cuales tenían funciones específicas de gran importancia para el funcionamiento celular. Sin embargo, hoy en día se conocen muchos procesos celulares que tienen lugar cerca de las membranas y se sabe que los lípidos que las constituyen pueden ejercer un papel muy importante en ellos. El papel de los lípidos ha ganado una merecida importancia ya que son muchas las funciones que estos compuestos ejercen en las membranas [6,12].

La desigual composición lipídica de las distintas membranas celulares así como las interacciones de determinados lípidos con otros lípidos o con proteínas revelan la importancia de estas moléculas sobre la señalización celular [6,10]. La relación de muchos procesos celulares con las membranas hace que la composición de éstas tenga una importancia crucial en el funcionamiento correcto de una célula, y cambios en el tipo o distribución de los lípidos que las integran pueden provocar alteraciones en muchos procesos celulares. Tanto es así que se han observado cambios en la composición lipídica de las membranas celulares en varias patologías [6,10,12], como por ejemplo el cáncer, en el que disminuyen los niveles de esfingomielina [13]. Esto refuerza la importancia del papel de los lípidos en los procesos de señalización celular.

La participación de los lípidos de membrana en el funcionamiento celular normal los convierte en una potencial diana terapéutica para el tratamiento de varias enfermedades. De esta idea surgió la terapia lipídica de membrana [10], un nuevo enfoque terapéutico cuyo objetivo es el desarrollo de fármacos que puedan tener efectos sobre los lípidos de las membranas con el fin de modificar su composición, estructura y/o propiedades físico-químicas [10,12]. Por medio de un cambio en la composición lipídica de la membrana puede alterarse su estructura y la interacción de los lípidos con las proteínas de la membrana, lo que resulta en cambios en la localización o actividad de dichas proteínas. Esto puede modificar la activación de las vías de señalización en las que participan con el fin de revertir los procesos patológicos que derivan de su función aberrante, provocada por el cambio patológico de la composición lipídica de la membrana, para así retornar a una situación no patológica [10,12].

Se proponen cinco formas de regular la composición y estructura de las membranas mediante el uso de fármacos basados en la terapia lipídica de membrana [12]. Estos mecanismos se resumen en la figura 2: 1) la unión directa del fármaco a la membrana para modificar su estructura y alterar la unión de determinadas proteínas a ella; 2) la regulación de una enzima cuya actividad afecta la composición lipídica de las membranas; 3) el cambio en la expresión génica de proteínas que regulan la composición lipídica de las membranas (a), la interacción entre proteínas y lípidos (b) o la interacción entre dos proteínas de membrana (c); 4) el cambio en la composición de microdominios para modular la localización de proteínas y 5) la actuación sobre una proteína para alterar su unión a la membrana.

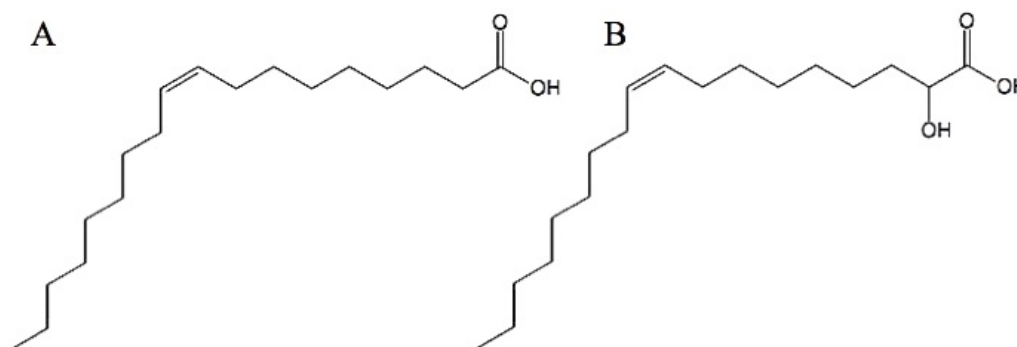




**Figura 2.** Diferentes mecanismos de acción de un fármaco basado en la terapia lipídica de membrana. Las formas rojas, amarillas y verdes indican la presencia de distintos microdominios de membrana. Las flechas marrones indican los posibles puntos de actuación del fármaco descritos en el texto. Extraída de [12].

### 1.4. Ácido 2-hidroxioléico

El Minerval o ácido 2-hidroxioléico (2OHOA), un derivado sintético del ácido oleico hidroxilado en posición 2 (véase la figura 3), es un ejemplo de compuesto diseñado de forma racional para actuar como fármaco basado en la estrategia de la terapia lipídica de membrana [12,14–16].



**Figura 3.** Estructura del ácido oleico (A) y del ácido 2-hidroxioléico (B).

Se trata de un fármaco con actividad anti-tumoral que en ratones y modelos celulares ha mostrado una mayor eficacia para el tratamiento de gliomas que la temozolomida. En los modelos animales empleados para el estudio, la administración oral de la sal sódica de 2OHOA inhibe el crecimiento del tumor y provoca una muerte de sus células, disminuyendo también el número de casos de reaparición del tumor [16]. Un efecto beneficioso similar se observa en el tratamiento de otros tumores con el mismo fármaco [17]. Además, este fármaco actúa de forma específica sobre las células cancerosas sin afectar a las células no cancerosas [13,15,16,18].

Estos hechos demuestran que el Minerval es una gran promesa para el tratamiento de gliomas. Actualmente, este fármaco se encuentra en fase I/IIa de un ensayo clínico para el tratamiento de gliomas y otros tumores sólidos (MIN-001-1203), y aproximadamente la mitad de los pacientes con glioma tratados con él han respondido al tratamiento con la paralización del desarrollo del tumor o incluso su remisión. Además, el 2OHOA ha sido declarado medicamento huérfano para el tratamiento de gliomas por la Agencia Europea de Medicamentos [15].

El mecanismo de acción del 2OHOA todavía no ha sido esclarecido por completo, pero se conocen muchos efectos moleculares provocados por su administración: se induce la parada del ciclo celular, diferenciación y muerte celular, ya sea por apoptosis [18] o autofagia [16] según el tipo celular.

#### 1.4.1. Incorporación a las membranas celulares

Cuando se administra, el 2OHOA se incorpora a las membranas de las células cancerosas y altera su estructura [14,17]. Puede incorporarse en forma libre o como integrante de fosfolípidos o triglicéridos, pero no de esfingolípidos [14–16]. En consecuencia, disminuye el contenido de ácido oleico de la membrana, probablemente debido a una sustitución de éste por el 2OHOA, y aumenta el contenido de ácido esteárico [14,15]. Esto provoca la inhibición de la actividad de la enzima estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1) en un 40-60% [14]. SCD1 es una enzima residente en el retículo endoplasmático que cataliza la formación de una insaturación en el ácido esteárico para dar ácido oleico en respuesta a determinados factores mitogénicos. Este es un proceso de mucha importancia en la síntesis *de novo* de ácidos grasos y en el control del contenido lipídico en células cancerosas para hacer frente a la creciente demanda de sustratos necesarios para la síntesis de membrana celular con la que mantener la elevada tasa de crecimiento que presentan las células tumorales. La inhibición de SCD1 por parte del 2OHOA se debe probablemente a la similitud de este compuesto con el producto natural de la enzima, el ácido oleico, el cual es un regulador negativo de su propia síntesis [14,15].

En conjunto, el 2OHOA provoca una alteración del orden global de la membrana [13,14] y aumenta la propensión a inducir fases no-lamelares de tipo hexagonal invertidas ( $H_{II}$ ) [15,17]. La acción de este fármaco induce un cambio en la composición, fluidez y estructura de las membranas de la célula cancerosa pero no de las células no tumorales [14]. Esta alteración de la membrana de las células tratadas con el fármaco tiene efectos sobre la actividad de algunas proteínas relacionadas con la proliferación, diferenciación y supervivencia celular [15,16].

El resultado final de la acción del 2OHOA sobre la membrana plasmática de líneas celulares de glioma implica un aumento del desorden y disminución de la presión lateral de los dominios  $l_d$ , así como un incremento del orden y la compactación de los dominios  $l_o$  [14,19].

#### 1.4.2. Activación de la esfingomielina sintasa

Uno de los efectos más importantes del 2OHOA en la membrana de las células cancerosas es la activación de la enzima esfingomielina sintasa (SMS) [13,15], la enzima responsable de la síntesis de esfingomielina a partir de ceramida y fosfatidilcolina [20]. Es muy probable que la activación de esta enzima se deba al contacto directo con el 2OHOA presente en la membrana [13].

La activación de esta enzima provoca un rápido aumento del contenido de esfingomielina en las membranas celulares junto a un aumento del contenido de 1,2-diacilglicerol, un producto secundario de la reacción, y una disminución del contenido en fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilcolina [13,16,21]. De esta forma, las membranas de las células cancerosas restauran la composición y estructura propias de una célula no cancerosa [13].

La rápida activación de la SMS provoca un incremento en la demanda celular de ceramida, uno de sus sustratos. Con el objetivo de hacer frente a la elevada demanda de esta molécula se activan las vías metabólicas que la sintetizan [21], por lo que también se acumulan ceramida y esfingosina en la célula tratada con 2OHOA. La acumulación de ceramida y otros esfingolípidos en la célula acaba por dar lugar a una desregulación del metabolismo de los esfingolípidos, lo que genera esfingolipidosis y disminuye la viabilidad celular pudiendo contribuir al efecto anti-tumoral del fármaco [15,21].

El cambio en la composición lipídica de la membrana que implica la activación de la SMS provocará cambios en la distribución de lípidos y proteínas, y esto tendrá efectos relevantes en algunos procesos de señalización celular [15,16].

### 1.4.3. Translocación de Ras al citosol

De forma concomitante al aumento en el contenido de esfingomielina en la membrana como resultado de la activación de la SMS, lo que implica un mayor orden en los dominios  $l_o$ , se produce un descenso del contenido de fosfatidiletanolamina [13]. Esto impide la unión de Ras a la membrana [15,16], ya que esta proteína se ancla en zonas de membrana desordenadas ricas en fosfatidiletanolamina y pobres en esfingomielina gracias a un grupo isoprenilo presente en su extremo C-terminal [6,15].

La proteína Ras es uno de los efectores iniciales de la vía de señalización de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK). La actividad de Ras es dependiente de su localización en la membrana plasmática, donde adquiere un nucleótido de GTP con el cual fosforila y activa las quinasas Raf y activa así la vía de señalización MAPK. Ras-GTP puede activar la quinasa PI3K, activando también la vía de señalización PI3K/Akt [22]. Las vías MAPK y PI3K/Akt se encuentran constitutivamente activadas en muchos tumores, entre ellos los gliomas, lo que resulta en un aumento de la proliferación celular, pérdida de diferenciación y resistencia a la muerte celular. Por lo tanto, la translocación de Ras desde la membrana hacia el citosol imposibilita la propagación de la señal de proliferación celular, por lo que se inhiben la vía MAPK y la vía PI3K/Akt (véase la figura 4). El resultado es una menor proliferación celular, parada del ciclo celular e inducción de autofagia [16].

### 1.4.4. Translocación de PKC a la membrana plasmática

La modificación de la membrana plasmática que ejerce el 2OHOA provoca un aumento de la propensión a la aparición de fases no-lamelares de tipo  $H_{II}$  [15,23]. Este hecho promueve la translocación de la proteína quinasa C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) desde el citosol hacia la membrana plasmática [16,17,24], a la que se une a través de su dominio regulador [6], y su consiguiente activación [15–17]. El 1,2-diacilglicerol generado a raíz de la síntesis de esfingomielina por la SMS contribuye a activar la PKC $\alpha$  de forma moderada [24], pues una activación excesiva puede potenciar la proliferación [25].

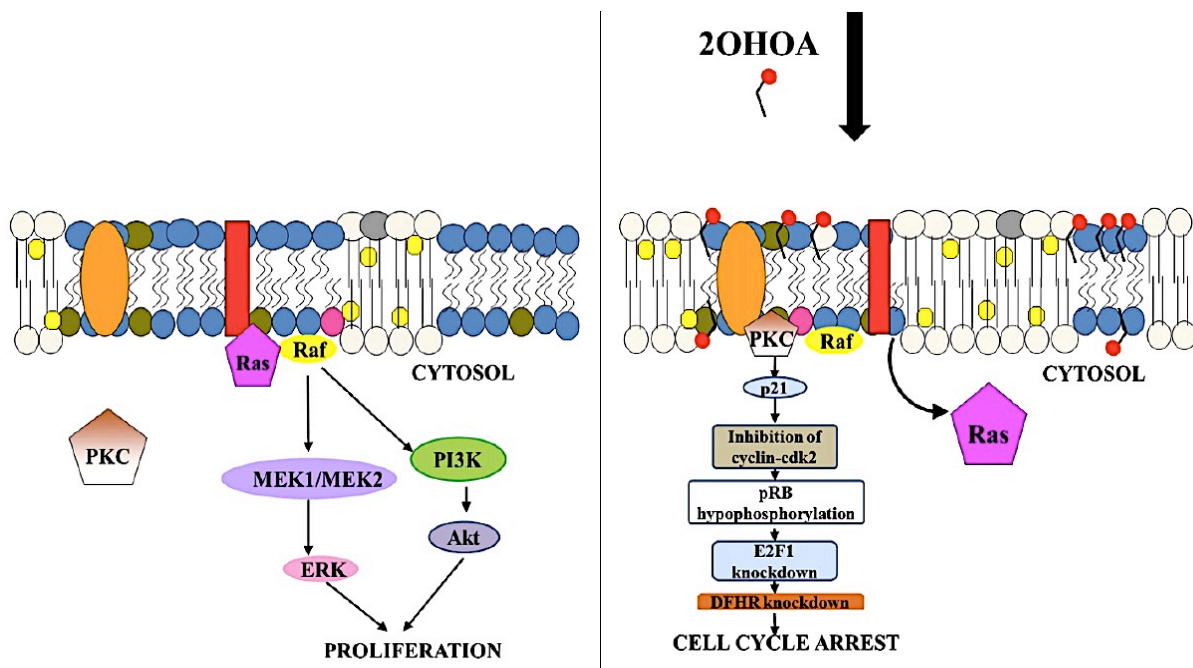
La PKC $\alpha$  es una Ser/Thr quinasa que actúa como un regulador negativo de la proliferación celular en varios tipos de tejidos [26]. Esta proteína activa las proteínas p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>, dos proteínas que pertenecen al grupo de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CKI) que inhiben la formación de complejos entre las CDK2 o CDK4 con ciclina D [17,25]. Los complejos D-CDK, activados por fosforilación a través de la vía de las MAPK [5], promueven la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb), activándola para liberar y activar el factor de transcripción E2F-1, que participa en el control de la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular [25]. Uno de los genes diana de E2F-1 es la enzima dehidrofolato reductasa (DHFR), de vital importancia para la síntesis de ácidos nucleicos y, por tanto, para la división celular (véase la figura 4). Por tanto, la activación de PKC $\alpha$  disminuye la fosforilación de pRb [26], reduciendo la actividad del factor de transcripción E2F-1 [17,25] y la expresión de DHFR [27] para parar el ciclo celular [15–17,19,27].

### 1.4.5. Inducción de apoptosis en leucemia

El aumento del contenido de esfingomielina en la membrana plasmática de la célula cancerosa como consecuencia del tratamiento con 2OHOA aumenta el orden de los dominios  $l_o$ , afectando así la localización de las proteínas que se localizan en este tipo de dominios [13]. En algunos tipos celulares, como leucemia, este aumento en el contenido de esfingomielina en la membrana puede facilitar la aproximación de receptores Fas (FasR o CD95) [28] y su activación sin necesidad de la unión de su ligando FasL [15,18]. Ésto provoca el reclutamiento de un complejo DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) y activación de pro-caspasas 8, por lo que se activa la vía extrínseca de la apoptosis [18].

### 1.4.6. Inducción de autofagia en glioma

La consecuencia final del tratamiento de células de glioma con 2OHOA es una inducción de diferenciación y posterior autofagia [16,29], un programa de muerte celular alternativo a la apoptosis. La activación del proceso autofágico se debe a la activación de CKI, la hipofosforilación de pRb y la disminución de la actividad de E2F-1 [30] provocadas por la activación de PKC $\alpha$ , y a la inhibición de Akt [30] provocada por la translocación de Ras al citosol. El incremento en la demanda de ceramida para mantener la elevada actividad esfingomielina sintasa provoca alteraciones en el metabolismo de los esfingolípidos que causan estrés prolongado en el retículo endoplasmático, lo que supone una activación de la respuesta a proteínas mal plegadas y la inhibición de la síntesis proteica [29]. Este hecho es incompatible con la supervivencia celular y desencadena su muerte por autofagia [16,29].



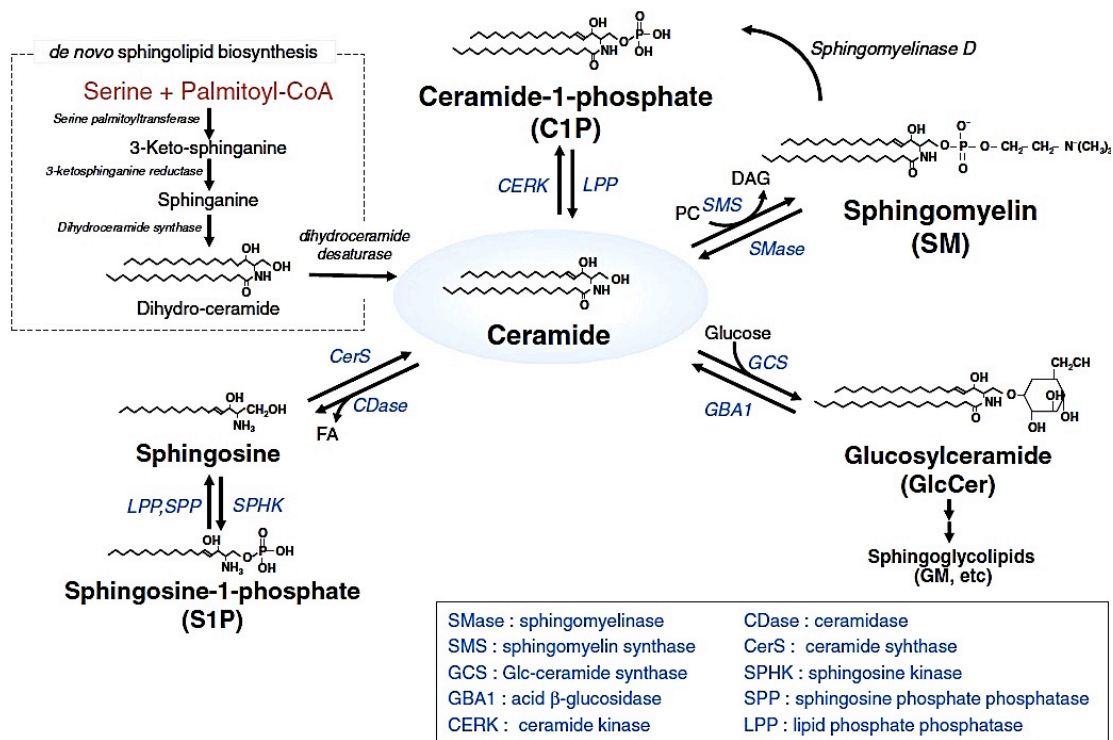
**Figura 4.** Principales efectos moleculares desencadenados por la incorporación de 2OHOA a la membrana plasmática de una célula cancerosa. El 2OHOA provoca una parada del ciclo celular gracias a la activación de PKC $\alpha$  como consecuencia de su translocación a la membrana plasmática, y a la inhibición de las vías MAPK y Akt/PI3K debido a la translocación de Ras al citosol. Extraída de [19].

## 1.5. Papel de los esfingolípidos en el funcionamiento celular

Los esfingolípidos son un componente esencial de las membranas celulares, especialmente de la membrana plasmática [6,8]. La esfingomielina es el esfingolípido más abundante [31], de la cual entre un 65 y 70% se encuentra en microdominios de membrana junto a moléculas de colesterol [31,32].

### 1.5.1. Implicación de los esfingolípidos en la señalización celular

El metabolismo de los esfingolípidos está formado por una compleja red de reacciones enzimáticas donde la ceramida ocupa una posición central [33] (véase la figura 5). La ceramida puede sintetizarse *de novo* a partir de la condensación de serina y palmitoil-CoA en el retículo endoplasmático, puede proceder de una vía de recuperación a partir de esfingosina o puede proceder del ciclo de la esfingomielina por acción de diferentes esfingomielinasas [33–35]. Este esfingolípido puede ser sustrato de varias enzimas que la convertirán en otros esfingolípidos más complejos, como la esfingomielina, la glucosilceramida, la ceramida 1-fosfato o la esfingosina 1-fosfato, que podrán tener funciones muy relevantes en el entorno celular [33,35].



**Figura 5.** Metabolismo de los esfingolípidos: conversión entre distintas moléculas y enzimas que catalizan dichas reacciones. Extraída de [34].

Todas las enzimas que participan en esta compleja red metabólica no regulan solamente los niveles de moléculas individuales sino también la interconversión de unas en otras, afectando al balance entre ellas [35]. Además, cada una de estas enzimas tiene una localización celular específica, cosa que añade un grado de complejidad a la regulación del metabolismo de los esfingolípidos así como a la función que pueden ejercer estos lípidos [33]. Estos hechos podrán ser claves en muchos procesos de señalización celular tan importantes como la diferenciación o proliferación [33,35].

La ceramida es un importante regulador de la supervivencia celular ya que puede disminuir la proliferación e inducir senescencia o muerte celular [33,35,36]. Numerosos estímulos ambientales de estrés promueven el aumento del contenido celular de ceramida, ya sea mediante la síntesis *de novo* o a través de su reciclaje a partir de esfingomiélinina o esfingosina [33]. Entonces, la ceramida puede interactuar con un gran número de dianas celulares diferentes, modulando su actividad. Un ejemplo de diana de la ceramida son las fosfatasa PP2A y PP1, que desfosforilan e inactivan proteínas como Akt, Bcl-2, CDK2 o pRb, entre otras, las cuales están implicadas en la promoción de la proliferación celular o inhibición del proceso apoptótico [33,35,36]. Otra diana de la ceramida es la PKCζ, a la cual activa para, a su vez, activar proteínas quinasas que responden a estrés celular mediante la regulación de procesos de *splicing* alternativo e inhibición de la síntesis proteica [36] para frenar la proliferación celular.

La señalización mediada por la ceramida está compartimentada, de forma que su acumulación podrá activar diferentes respuestas en función del orgánulo donde se localiza esta molécula [35,37]. Por ejemplo, la ceramida generada en los lisosomas por activación de la esfingomiélinasa ácida tiene como diana la catepsina D [33,35], que conducirá a la proteólisis de las pro-caspasas 9 y 3 a través de la activación de BID. Por otro lado, la ceramida procedente de la degradación de esfingomiélinina en las membranas mitocondriales por acción de la esfingomiélinasa neutra, la cual se puede activar por la presencia de especies reactivas de oxígeno, activará PP2A y PP1. La primera inactivará a Bcl-2 y Akt, mientras que la segunda podrá desfosforilar la pRb y podrá activar a BID para inducir apoptosis [35].



La ceramida generada por acción de esfingomielinasas sobre la esfingomielina de la membrana plasmática tendrá una relevante participación en la regulación de la señalización que median algunos receptores de membrana [33,35].

Por otro lado, la esfingosina 1-fosfato (S1P) juega un papel contrario a la ceramida en relación a la supervivencia celular ya que está implicada en la inducción de la proliferación, la inhibición de la apoptosis y la estimulación de la angiogénesis [33,35]. La S1P se forma en la cara citosólica de la membrana plasmática por fosforilación de esfingosina a través de una reacción catalizada por la enzima esfingosina quinasa como respuesta a factores de crecimiento o citoquinas. Para desencadenar una respuesta celular, la S1P debe translocarse a la cara exoplásmica de la membrana, donde interactúa con su receptor específico (S1PR). La interacción S1P-S1PR activa una serie de proteínas G que promoverán la activación de la vía MAPK y de Akt, y con ello la proliferación celular [33].

### **1.5.2. Esfingolípidos como dianas terapéuticas**

Es muy posible que exista un equilibrio entre la cantidad de ceramida y de S1P en la célula de tal forma que actúe como un control de la proliferación celular o la muerte por apoptosis [36,38]. Los niveles de ceramida y de S1P pueden ser manipulados mediante la administración de determinados fármacos, lo que convierte a los esfingolípidos en una interesante diana terapéutica para el tratamiento del cáncer [38]. Por otro lado, niveles bajos de ceramida en las células cancerosas, por ejemplo debido a un aumento de la actividad glucosilceramida sintasa, se han relacionado con una resistencia a la quimioterapia administrada en varios tipos de tumores [35], cosa que resulta muy perjudicial para su tratamiento.

Por tanto, el papel de la ceramida en la regulación de la supervivencia celular resulta muy interesante para el desarrollo de agentes terapéuticos anti-tumorales. Muchos fármacos quimioterapéuticos provocan un aumento del contenido celular de ceramida, ya sea promoviendo su síntesis o inhibiendo su degradación, lo que aumenta la efectividad del tratamiento [38]. Aquellos tratamientos que aumentan la cantidad de ceramida presente en las membranas conllevan una inhibición de la proliferación, la parada del ciclo celular o la muerte [33,35,38], al igual que aquellos tratamientos cuyo mecanismo de acción implica la atenuación de la señalización mediada por S1P [35]. Se están probando nuevos fármacos que actúan incrementando la presencia de ceramida en las membranas celulares o mimetizando su actuación anti-proliferativa [35,38]. La manipulación de los niveles de ceramida pueden suponer un mecanismo clave para disminuir la viabilidad de las células tumorales e inhibir su crecimiento [35]. Estudios en fases pre-clínicas revelan que el uso de fármacos que estimulan la síntesis de ceramida combinados con otros agentes que inhiben el catabolismo de este esfingolípido presentan características anti-tumorales [37,38].

### **1.6. Esfingomielina sintasa**

La SMS fue identificada por dos grupos de investigación independientes en el año 2004 [39,40], aunque antes ya se conocía la existencia de una proteína con la capacidad de sintetizar esfingomielina.

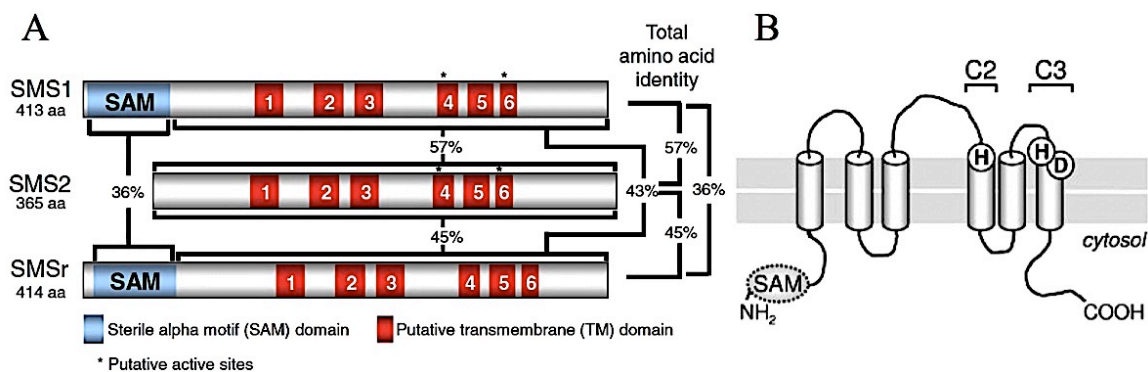
Gracias a su trabajo, se hallaron tres genes que codifican tres isoformas distintas de SMS, llamadas SMS1, SMS2 y SMSr (véase la tabla 2) [39]. Cada una de estas proteínas tiene una localización celular distinta, donde lleva a cabo su función. La SMS1 se localiza exclusivamente en el aparato de Golgi y la SMSr lo hace únicamente en el retículo endoplasmático. La localización principal de la SMS2 es la membrana plasmática, aunque también se encuentra en el aparato de Golgi en una proporción menor [20,34,39,41,42].

Proteína	Gen (locus / kb)	Aminoácidos (kDa)	Compartimento celular
<b>SMS1</b>	<i>SGMS1</i> (10q11.2 / 319.5)	413 (49)	Aparato de Golgi
<b>SMS2</b>	<i>SGMS2</i> (4q25 / 90.7)	365 (42)	Membrana plasmática (+) Aparato de Golgi (-)
<b>SMSr</b>	<i>SAMD8</i> (10q22.2 / 82.6)	414 (49)	Reticulo endoplasmático

**Tabla 2.** Datos de las distintas isoformas de SMS y sus respectivos genes. Basada en información de [34].

A partir de la secuencia de aminoácidos de estas proteínas se ha podido desarrollar un modelo predictivo de su estructura, que contempla la existencia de seis hélices  $\alpha$  transmembrana conectadas a través de bucles hidrofílicos [20,34,39]. Este modelo predice que los dos extremos de la cadena polipeptídica se hallan en la cara citoplasmática de la membrana, a diferencia del centro catalítico de la enzima, que se orientaría hacia la cara exoplasmática [20,41]. Además, también se ha hallado en el extremo N-terminal de la SMS1 y de la SMSr, pero no en la SMS2, una secuencia que codifica un dominio SAM (*Sterile Alpha Motif*), un dominio de interacción entre proteínas [34,39]. Por otro lado, la SMS2, pero no la SMS1, presenta en su extremo C-terminal un grupo de cisteínas que pueden ser objeto de palmitoilación, lo que es importante para su localización en la membrana plasmática [43].

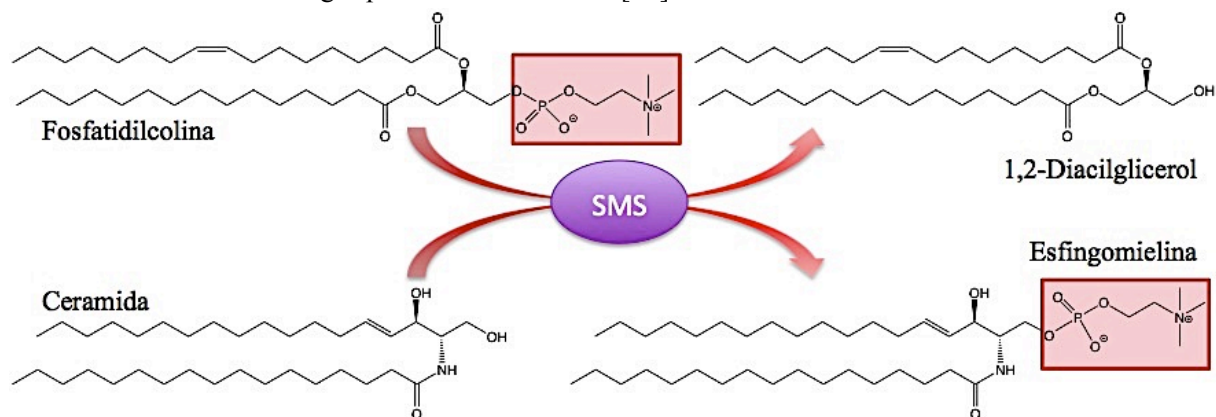
El estudio de la secuencia de las enzimas SMS1 y SMS2 revela la presencia en ambas proteínas de cuatro motivos estructurales conservados, llamados D1, D2, D3 y D4. Los motivos D3 y D4, localizados en las hélices transmembrana 4 y 6, respectivamente, son similares a los dominios C2 y C3 de las enzimas lípido fosfato fosfatasa (LPP) [34,39,41]. Esta similitud estructural incluye una tríada catalítica presente en las LPP, formada por dos residuos de histidina y un aspartato. Los residuos catalíticos de la SMS1 son H285, H328 y D322, que en la SMS2 corresponden a H229, H272 y D276. Además de estos residuos catalíticos, el motivo D3 también contiene un residuo de serina altamente conservado que es importante para la función catalítica de la SMS aun sin participar directamente en la reacción. Estos residuos son S283 en SMS1 y S227 en SMS2 [41].



**Figura 6.** (A) Esquema de la estructura de SMS1, SMS2 y SMSr, incluyendo las hélices transmembrana, el dominio SAM y los sitios catalíticos homólogos a las LPP, junto al grado de homología entre diferentes proteínas. Extraída de [34]. (B) Predicción de la estructura de la SMS1 en base a su secuencia de aminoácidos. Los residuos HHD señalados en los motivos C2 y C3 constituyen el centro activo de la enzima. Extraída de [20].

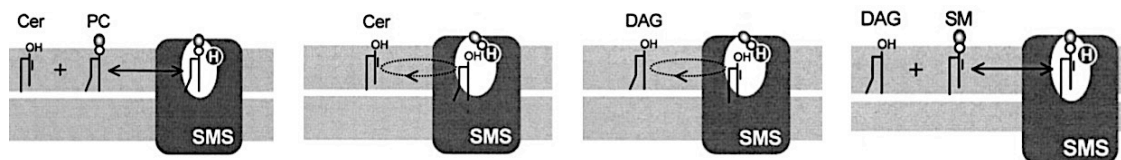
Los genes *SGMS1* y *SGMS2* se expresan de forma ubicua en los tejidos humanos [34,39], donde catalizan la transferencia de un grupo fosfocolina desde una molécula de fosfatidilcolina a ceramida para generar esfingomiélin y 1,2-diacilglicerol (véase la figura 7), o bien la reacción inversa a esta [20,21,32,34,41]. El principal punto de síntesis de esfingomiélin en la célula es la cara luminal del aparato de Golgi [20,34,42], coincidiendo con la localización de la SMS1. Esta proteína contribuye en mayor cantidad al contenido total de esfingomiélin de una célula, sumando entre el 60 y 80% del total de la actividad SMS de la célula, y la SMS2 lo hace en menor medida, en concreto del 20 a 40%

de la actividad SMS restante [42,31]. Se piensa que la SMS2 podría tener un papel más bien regulador del contenido de este esfingolípido en la membrana [32].



**Figura 7.** Reacción enzimática catalizada por la SMS: transferencia de un grupo fosfolina a una molécula de ceramida para dar lugar a esfingomielina y 1,2-diacilglicerol. Basada en una figura de [15].

Para la síntesis de esfingomielina (véase la figura 8), la SMS une a su centro activo una molécula de fosfatidilcolina. El residuo de histidina presente en el motivo D4 (H328 en SMS1 o H272 en SMS2) efectúa un ataque nucleofílico sobre el enlace éster que une el grupo fosfolina y el resto del lípido, formándose un intermediario colina-fosfohistidina sobre la estructura de la enzima. En este momento se libera 1,2-diacilglicerol de vuelta a la membrana y una molécula de ceramida ocupa el centro activo de la enzima. El intermediario colina-fosfohistidina realiza un ataque nucleofílico sobre un hidroxilo primario de la ceramida gracias a la participación de la histidina del motivo D3 (H285 en SMS1 o H229 en SMS2), provocando la unión del grupo fosfolina a la ceramida, es decir, sintetizándose esfingomielina y liberándola a la cara exoplasmática de la membrana [20].



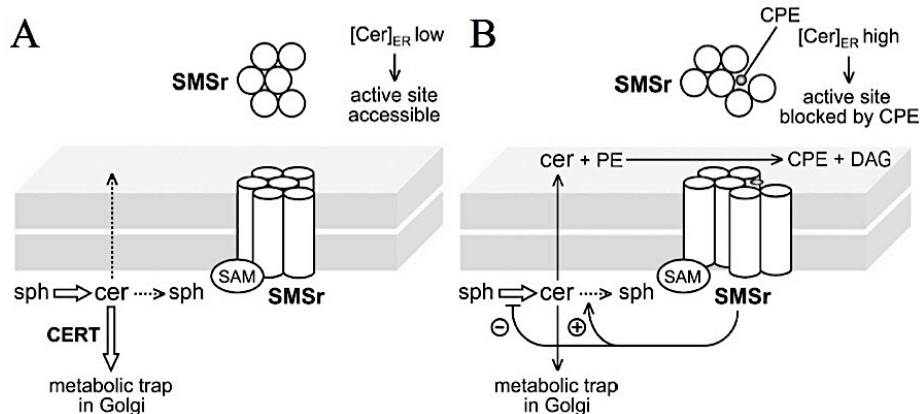
**Figura 8.** Mecanismo catalítico propuesto para la síntesis de esfingomielina por la SMS. Extraída de [20].

La SMSr no tiene capacidad para sintetizar esfingomielina ni para hidrolizarla, por lo que la síntesis de esfingomielina se reserva a las isoformas SMS1 y SMS2. En cambio, la SMSr está implicada en la síntesis de un compuesto llamado ceramida fosfoetanolamina (CPE) mediante un mecanismo catalítico similar al descrito para la SMS1 y SMS2 [20,44]. Se postula que el CPE puede ser metilado y convertido en esfingomielina en el retículo endoplasmático, pero todavía no se ha demostrado la relevancia de este proceso en la célula [39,44].

Algunos estudios indican que la CPE sintasa de la SMSr está relacionada con la homeóstasis de la ceramida en el retículo endoplasmático [44,45]. En condiciones normales, la ceramida sintetizada *de novo* es transportada rápidamente al aparato de Golgi para ser sustrato de la SMS1 o de la glucosilceramida sintasa, por lo que solamente una poca cantidad de ceramida es convertida en CPE. Sin embargo, si se produce una acumulación de ceramida en el retículo endoplasmático, una mayor cantidad de ceramida podrá alcanzar la enzima y ser convertida en CPE, el cual permanece unido al centro activo de la SMSr, debido a que esta molécula tiene una elevada afinidad por la proteína, y bloquea su actividad enzimática. Esto provoca un cambio en la conformación de la SMSr que inhibe la síntesis de ceramida y estimula la conversión de ésta en otros esfingolípidos [44]. Se sabe que el dominio SAM de SMSr tiene un papel relevante en este proceso de señalización [45]. Alteraciones en la función catalítica de SMSr o en su dominio SAM conllevarán una acumulación anómala de



ceramida en el retículo endoplasmático que podrá iniciar el proceso de muerte celular por apoptosis [44,45]. Recientemente se ha demostrado que las isoformas SMS1 y SMS2 también tienen capacidad para sintetizar CPE, pero se desconoce cómo afecta esto al funcionamiento celular [46]



**Figura 9.** Modelo que explica el papel de SMSr en el mantenimiento de la homeostasis de la ceramida en el retículo endoplasmático. Extraída de [44].

Tanto la SMS1 como la SMS2 son de vital importancia para el mantenimiento del contenido de esfingomielina en la membrana plasmática de la célula [42], mientras que la SMSr juega un papel destacado en la homeostasis de la ceramida [44]. La reacción de síntesis o hidrólisis de esfingomielina catalizada por la SMS supone la generación de componentes estructurales de las membranas celulares, es decir esfingomielina y fosfatidilcolina, y moléculas lipídicas implicadas en señalización molecular, es decir ceramida y 1,2-diacilglicerol, relacionados con la inducción de muerte celular y proliferación, respectivamente. Dado que dos de los sustratos y productos de la reacción catalizada por esta enzima están muy relacionados con la supervivencia celular, parece poco probable que la dirección en que transcurre dicha reacción se determine únicamente en base a la abundancia relativa de estas moléculas [20]. La desregulación de cualquiera de estas enzimas conlleva consecuencias en la homeostasis de los esfingolípidos, alterando el funcionamiento, supervivencia o muerte de la célula afectada [13,24,44].

Por este motivo, es posible que existan mecanismos de regulación de la actividad de esta enzima que a día de hoy no han sido descubiertos. Son varios los hechos que sustentan esta sospecha. Uno de ellos es que todavía se desconocen qué proteínas interaccionan con el dominio SAM de ninguna de las SMS que lo contiene [20], interacción que podría estar implicada en la regulación de su actividad ya que se sabe que estos dominios pueden estar muy implicados en procesos de transducción de señal. Otro motivo es que se han descrito formas de *splicing* alternativas de la SMS1 que afectan tanto a la secuencia y tamaño de su mRNA como a la longitud de la proteína, incluso se han hallado varios promotores y sitios de poliadenilación alternativos que pueden modular la transcripción del gen *SGMS1* [47]. En diferentes tejidos se expresan transcritos del gen *SGMS1* que difieren en la estructura de las regiones 5' y 3' no traducida (5'-UTR y 3'-UTR, respectivamente), lo cual puede estar relacionado con la eficacia con la que se traduce dicho mensajero y afectar a la cantidad de proteína SMS1 en la célula. Se ha descrito también la expresión de formas truncadas de la SMS1 que carecen de su extremo N-terminal o C-terminal, por lo que pierden el dominio SAM o su centro activo, respectivamente [47]. Se desconoce cuál es la función que ejercen estas proteínas truncadas.

Debido a la implicación de la SMS en la interconversión de moléculas implicadas en la supervivencia celular, a la presencia de un dominio de interacción con proteínas relacionadas con la transducción de señales tanto en SMS1 como en SMSr pero no en SMS2 y a la existencia de diferentes formas de *splicing* y expresión de la proteína SMS1, no debe descartarse la posibilidad de que la SMS pueda estar implicada en el correcto funcionamiento celular más allá de la reacción enzimática que cataliza.

## 2. Objetivos

La literatura científica sitúa la esfingomielina sintasa en un punto clave del metabolismo de los esfingolípidos, ya que cataliza una reacción cuyos sustratos y productos, es decir la ceramida y el 1,2-diacilglicerol, parecen tener una gran relevancia en la transducción de señales y el funcionamiento celular en relación a la supervivencia o muerte de la célula.

La mayoría de los estudios realizados hasta día de hoy indican que el aumento de la concentración intracelular de ceramida en las células tumorales puede tener efectos beneficiosos, como el cese de la proliferación y la inducción de la apoptosis. Por ello, muchas de las publicaciones donde se ha analizado la proliferación celular en relación a los cambios en el metabolismo de los esfingolípidos han concluido que una inhibición de la SMS puede comportar un aumento del contenido de ceramida y, con ello, desencadenar una respuesta favorable para el tratamiento del cáncer. El estudio del mecanismo de acción del 2OHOA, un fármaco anti-tumoral desarrollado en base a los preceptos de la terapia lipídica de membrana que está mostrando prometedores resultados, ha puesto de manifiesto que la activación de la SMS podría ser uno de los puntos claves del tratamiento de gliomas y otros tipos de tumores.

A día de hoy, solamente se puede concluir que la SMS desempeña un papel importante en la proliferación celular, y no son pocas las incógnitas que hay alrededor de esta enzima y de su papel en el funcionamiento de la célula, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por estos motivos, es importante seguir indagando en el papel que juega la SMS en la proliferación y muerte celular.

Este trabajo pretende evaluar el efecto de las diferentes isoformas de la SMS en la viabilidad de diferentes líneas celulares de glioma mediante una transfección transitoria que permita la sobre-expresión de las isoformas SMS1 y SMS2, con el fin de determinar si un aumento en la presencia de estas enzimas es o no favorable para la supervivencia de las células analizadas.

Para ello, los objetivos de este trabajo son:

1. Evaluar las posibles diferencias en la viabilidad celular como consecuencia de la sobre-expresión de SMS1 o SMS2 en diferentes células de glioma mediante contaje manual.
2. Evaluar el efecto sobre la proliferación celular que ejerce la sobre-expresión de SMS1 o SMS2 en combinación con la administración de 2OHOA en las mismas líneas celulares mediante contaje manual.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Reactivos

Los medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM, y la solución de *Trypan blue* al 0.4% fueron comprados en Sigma. El suero bovino fetal (FBS) y el medio *Opti-MEM<sup>®</sup> Reduced Serum Medium* se obtuvieron de la casa comercial Gibco. Los antibióticos penicilina y estreptomycin (P/S) fueron adquiridos en Biowest. La tripsina-EDTA era procedente de Labclinics. En Invitrogen se compró *Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent*. Los plásmidos pEF1 $\alpha$  y pTRE3G y la doxiciclina se obtuvieron de Clontech Laboratories. La sal sódica de 2OHOA procedía de Avanti Polar Lipids. El inhibidor de proteasas *cOmplete EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail Tablets EASYpack<sup>®</sup>* se adquirió en Roche.

### 3.2. Cultivo celular

Las líneas celulares usadas en este trabajo fueron SF-295, U-87 MG y U-251, todas ellas procedentes de glioblastoma humano. La primera se adquirió de la casa comercial AddexBio, mientras que las otras dos se obtuvieron de la ECACC (*European Collection of Autheticated Cell Cultures*).

Las líneas celulares U-251 y SF-295 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de FBS y un 1% de P/S. La línea celular U-87 MG fue cultivada en medio DMEM, el cual también se suplementó con un 10% de FBS y un 1% de P/S. Las tres líneas se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37 °C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3. Transfección transitoria

Cada transfección se realizó en placas de 6 pocillos. En cada pocillo se sembraron 300.000 células en un volumen total de 2 mL del mismo medio completo usado para su cultivo. Dos pocillos eran muestras control, en otros dos se sobre-expresó una isoforma de la SMS y en los dos restantes se sobre-expresó la misma isoforma de SMS y además se trató con 2OHOA.

Al día siguiente se realizó la transfección. Como método de transfección se usó la lipofección, un método basado en lípidos catiónicos que forman liposomas en cuyo interior se encuentra el material genético que se quiere introducir en la célula. Estos liposomas que contienen material genético tienen la capacidad de interactuar con las membranas plasmáticas de las células de un cultivo y fusionarse con ellas, liberando así su contenido en el citoplasma de la célula [48].

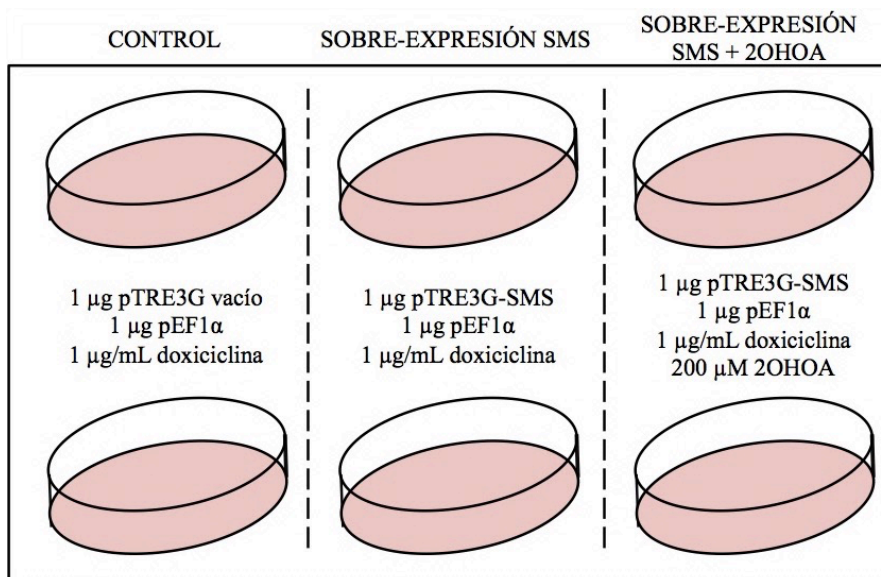
Para la formación de liposomas se usó el reactivo Lipofectamina<sup>®</sup> y se siguieron las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. Para la preparación del reactivo de transfección se necesitaron dos tubos Eppendorf<sup>®</sup> (véase la tabla 3). En el primero (A), se mezclaron 150  $\mu$ L del medio de transfección Opti-MEM<sup>®</sup> y 4  $\mu$ L de Lipofectamina<sup>®</sup> por cada pocillo a transfectar. En el segundo (B), se mezclaron 150  $\mu$ L del medio Opti-MEM<sup>®</sup> y el material genético, que en este caso fueron dos plásmidos: se usaron 1  $\mu$ g del plásmido pTRE3G y 1  $\mu$ g del plásmido pEF1 $\alpha$ . El volumen de cada plásmido necesario para disponer de la cantidad requerida por el protocolo pudo determinarse a partir de la concentración de la alícuota en la que se encontraba cada plásmido, determinada con un NanoDrop<sup>®</sup> (Thermoscientific). Para los controles se empleó un plásmido pTRE3G sin inserto, mientras que para las muestras de sobre-expresión se usó un plásmido pTRE3G que contenía el gen de la SMS1 o SMS2.

Para 2 pocillos control	Para 4 pocillos con sobre-expresión
Tubo A <ul style="list-style-type: none"> <li>• 300 <math>\mu</math>L Opti-MEM<sup>®</sup></li> <li>• 8 <math>\mu</math>L Lipofectamina<sup>®</sup></li> </ul> Tubo B <ul style="list-style-type: none"> <li>• 300 <math>\mu</math>L Opti-MEM<sup>®</sup></li> <li>• 2 <math>\mu</math>g pEF1<math>\alpha</math></li> <li>• 2 <math>\mu</math>g pTRE3G vacío</li> </ul>	Tubo A <ul style="list-style-type: none"> <li>• 600 <math>\mu</math>L Opti-MEM<sup>®</sup></li> <li>• 16 <math>\mu</math>L Lipofectamina<sup>®</sup></li> </ul> Tubo B <ul style="list-style-type: none"> <li>• 600 <math>\mu</math>L Opti-MEM<sup>®</sup></li> <li>• 4 <math>\mu</math>g pEF1<math>\alpha</math></li> <li>• 4 <math>\mu</math>g pTRE3G-SMS</li> </ul>

**Tabla 3.** Volúmenes y cantidades de los reactivos usados para la formación de liposomas y transfección de las células sembradas en una placa de 6 pocillos.

Después de cinco minutos, el tubo B se mezcló en el tubo A, y se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante diez minutos, tiempo en el que se formaban los liposomas conteniendo los plásmidos. Finalmente, se pipetearon 300  $\mu$ L de la mezcla de liposomas a cada pocillo de la placa y se añadió en cada uno de ellos 1 mL de su correspondiente medio completo.

Cinco horas después de la transfección se realizó un cambio de medio. Para ello, se aspiró el medio de cada pocillo y se añadieron 2 mL de medio completo. A continuación se añadieron los tratamientos necesarios (véase la figura 10). Se pipetearon 2  $\mu$ L de doxiciclina 1 mg/mL a cada uno de los seis pocillos de la placa, para que su concentración final fuera de 1  $\mu$ g/mL, y en dos de los pocillos con sobre-expresión se añadieron 4  $\mu$ L de 2OHOA 100 mM para que su concentración final fuera 200  $\mu$ M.

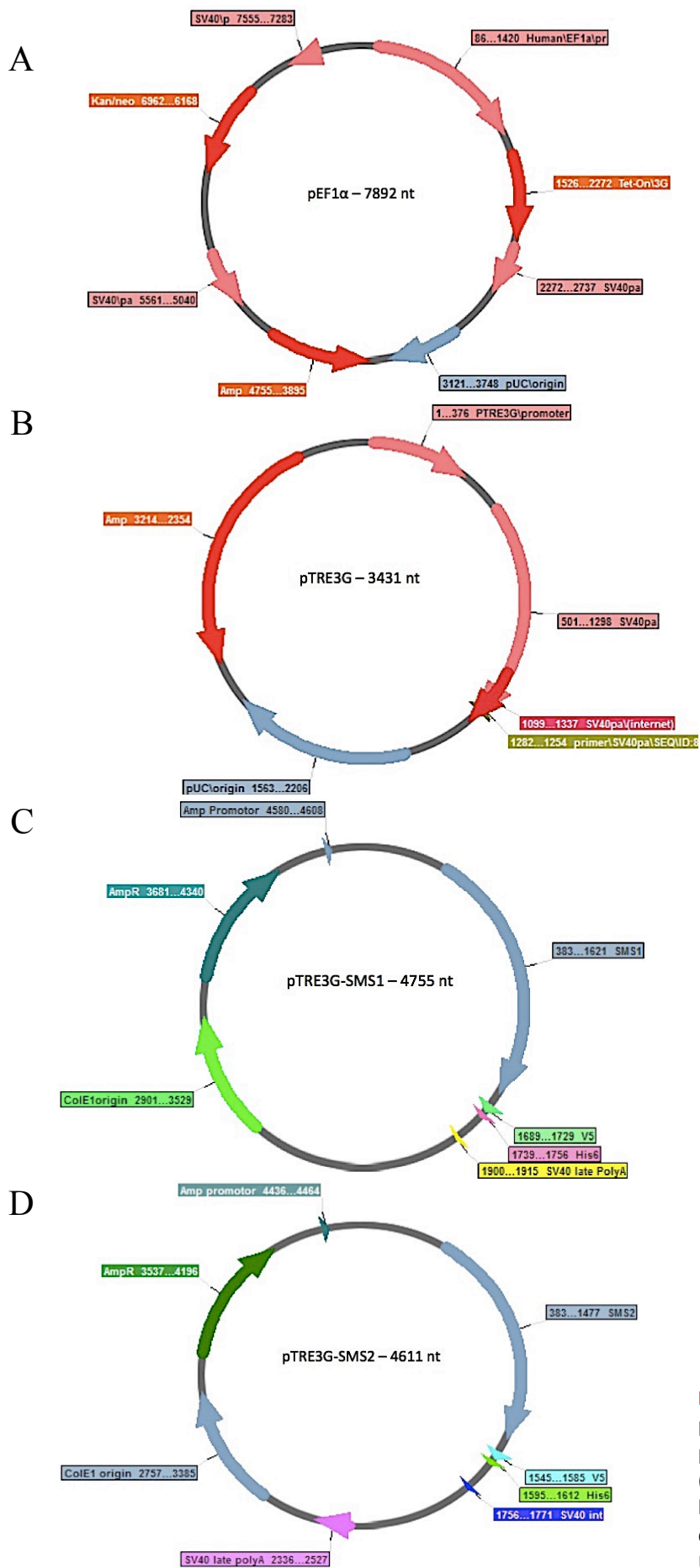


**Figura 10.** Esquema de distribución de muestras y reactivos en una placa de cultivo de seis pocillos.

### 3.3.1. Construcción génica de SMS y plásmidos usados

La construcción génica de SMS1 o de SMS2 introducida en el plásmido estaba compuesta del cDNA de cada una de estas enzimas, de 1239 y 1095 pares de bases, respectivamente. En ambos casos, se añadió al extremo 3' de la construcción génica un epítipo V5 (de secuencia GKPIPPLLGLDST, que equivale a 42 pares de bases) y seis residuos de histidina (de 18 pares de bases), los cuales sirven como etiqueta para identificar la proteína sobre-expresada.

Tal y como ya se ha explicado al principio de la sección 3.3., el material genético usado en la transfección es un conjunto formado por dos plásmidos llamados pEF1 $\alpha$  y pTRE3G. El segundo fue el que contenía el gen de interés, es decir la SMS1 o la SMS2 (véase la figura 11).



**Figura 11.** Mapas de los plásmidos (A) pEF1 $\alpha$ , (B) pTRE3G, (C) pTRE3G-SMS1 y (D) pTRE3G-SMS2 usados en las transfecciones transitorias de las líneas celulares U-251, U-87 MG y SF-295.

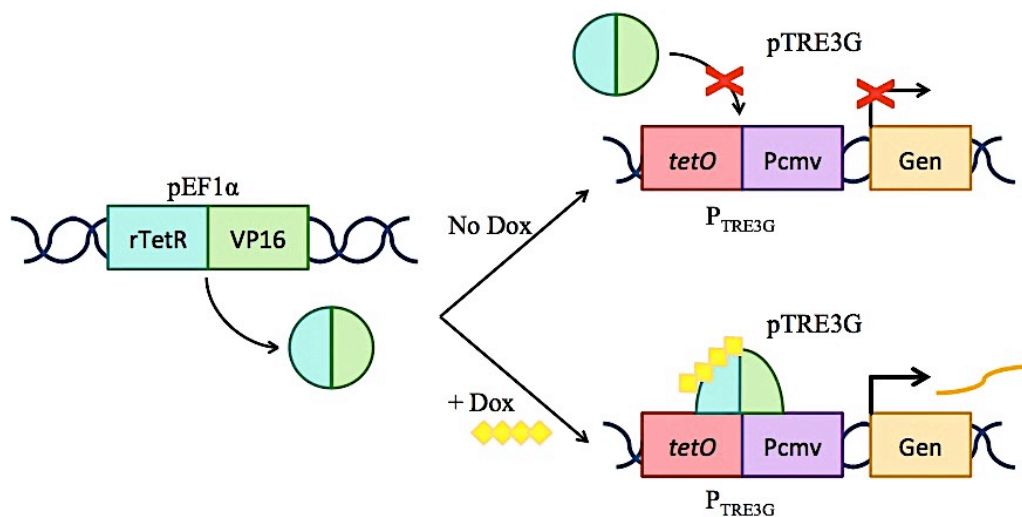
Se usaron diferentes versiones del plásmido pTRE3G según el objetivo de la transfección. Por un lado, el plásmido podía contener la construcción génica de la SMS1 o la SMS2, que se ha descrito anteriormente, y ser usado para transfectar muestras donde se deseaba obtener una sobre-expresión de la enzima. Por otro lado, el pTRE3G podía no contener ninguna construcción génica y ser usado en la transfección de las muestras control. Gracias a este último plásmido, los controles pudieron someterse a la misma transfección y administración de doxiciclina para provocar la expresión del gen contenido en el plásmido pTRE3G, es decir, ninguno. La finalidad de este procedimiento fue aplicar a todas las muestras las mismas manipulaciones y condiciones para que no se observasen diferencias en la viabilidad debidas a variaciones en los procedimientos aplicados en cada una de ellas.

### 3.3.2. Sistema de sobre-expresión de SMS

Los plásmidos pEF1 $\alpha$  y pTRE3G conforman un sistema llamado Tet-On<sup>®</sup> 3G *Inducible Expression System* desarrollado por Clontech Laboratories en base al trabajo de Manfred Gossen y colaboradores de 1995 [49].

A partir del plásmido pEF1 $\alpha$  se expresa una proteína transactivadora que combina el dominio de unión a DNA de la proteína represora del operón de resistencia a tetraciclinas de *E. coli* mutada para que se una a su secuencia diana en presencia de una tetraciclina (rTetR) y el dominio de activación de la expresión génica de la proteína 16 del virus del Herpes simple (VP16). Por otro lado, el plásmido pTRE3G contiene el gen de interés bajo el control de un promotor P<sub>TRE3G</sub>, el cual está formado por un promotor mínimo de citomegalovirus humano (Pcmv) y las secuencias del operador tet de *E. coli* (*tetO*) [49,50].

En presencia de doxiciclina, una tetraciclina sintética, la proteína transactivadora tiene capacidad de unirse a la región *tetO* del promotor P<sub>TRE3G</sub> gracias a rTetR y activar la expresión del gen de interés gracias a VP16 y a la presencia de Pcmv. Por el contrario, en ausencia de doxiciclina, la proteína transactivadora no puede unirse a su secuencia diana por lo que no se activa la expresión del gen del plásmido pTRE3G (véase la figura 12) [50].



**Figura 12.** Esquema del funcionamiento de los elementos del sistema Tet-On<sup>®</sup> 3G. Basado en información obtenida de [49,50].

### 3.4. Recogida de células

48 horas después de la transfección, las células fueron recogidas para analizar su viabilidad. Para ello, se recogió el medio de cada pocillo en un tubo Falcon de 15 mL diferente y se lavó cada pocillo con



0.5 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4). A continuación se añadieron 0.5 mL de tripsina (0.025% (p/v) tripsina en PBS, 1 mM EDTA) por pocillo y se dejó reposar la placa durante unos 3 minutos dentro del incubador, a 37 °C, para que las células dejaran de adherirse a la placa. Una vez transcurrido ese tiempo, la actividad de la tripsina de cada pocillo fue inhibida con el medio previamente recogido, quedando las células en suspensión. De esta forma se pudieron recoger en distintos tubos todas las células de cada pocillo.

25 µL de cada muestra recogida fueron traspasados a un tubo Eppendorf y destinados al conteo celular. El volumen restante de muestra fue centrifugado durante 10 minutos a 800g. A continuación se eliminó el sobrenadante, que solamente se componía de medio de cultivo, y el precipitado de células fue resuspendido en 150 µL de buffer hipotónico (20 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1x cóctel de inhibidor de proteasas, SDS 1%). Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

### **3.5. Contaje celular**

Los 25 µL de muestra destinados al conteo celular fueron mezclados con otros 25 µL de *Trypan blue* al 0.4%, resultando en una dilución de la concentración de muestra a la mitad. El *Trypan blue* es un colorante usado como test de exclusión que permite el recuento manual de células viables sin tener en cuenta las células muertas, puesto que las células vivas repelen la absorción de este colorante, debido a la permeabilidad selectiva de su membrana plasmática, mientras que no lo hacen las células muertas, en las cuales el colorante atraviesa la membrana plasmática y tiñe de azul su citoplasma.

Aproximadamente unos 10 µL de la mezcla de muestra y colorante en proporción 1:1 se depositaron en cada compartimento de una cámara Bürker. A través de la observación de la muestra con un microscopio, a 100 aumentos, se contó manualmente el número de células viables. A partir del volumen de muestra y del número de células contadas, y teniendo en cuenta la dilución de la muestra resultante de añadir el colorante, se pudo determinar el número de células totales de cada muestra.

### **3.6. Análisis estadístico**

Todos los resultados de este trabajo se expresan como la media ± SEM del porcentaje de células de cada muestra en referencia a su control. Se realizó un mínimo de tres experimentos independientes en cada caso. Se usó el software GraphPad Prism 6 para analizar dichos resultados mediante ANOVA de dos vías seguido de pruebas t-Student corregidas según el método de Bonferroni para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los distintos grupos de muestras. Se consideran diferencias significativas aquellas con  $p < 0.05$  (\*).

## 4. Resultados

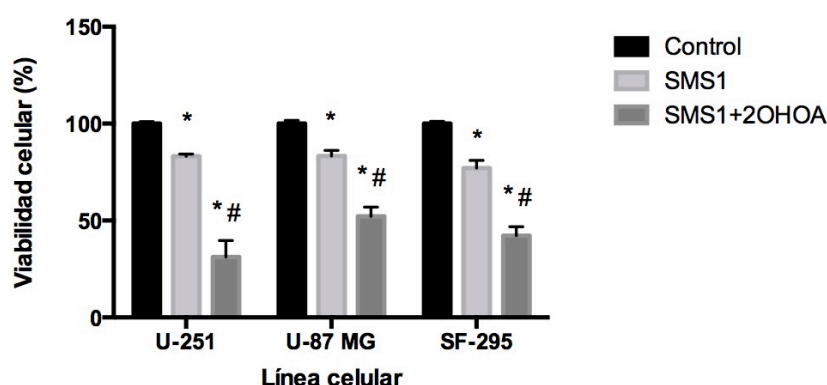
La viabilidad celular resultante de la sobre-expresión de una isoforma de SMS y/o la administración de 2OHOA 200  $\mu$ M se determinó mediante el conteo manual de las muestras transfectadas por lipofección con los plásmidos pTRE3G y pEF1 $\alpha$ .

### 4.1. Viabilidad celular con sobre-expresión de SMS1

Los resultados obtenidos en la determinación de la viabilidad celular en caso de sobre-expresión de la proteína SMS1 se presentan en la figura 13.

En las tres líneas de glioma estudiadas se observó un cambio muy similar en la viabilidad celular debido a la sobre-expresión de la SMS1 con respecto al control, disminuyendo aproximadamente un 20% el número de células en los tres casos. Esta disminución de la viabilidad celular resultó significativa en las tres líneas.

El tratamiento con 2OHOA 200  $\mu$ M contribuyó notablemente a la disminución de la viabilidad celular cuando se combinó con la sobre-expresión de la enzima SMS1. La adición de este fármaco a la línea celular U-87 MG resultó en una disminución de aproximadamente un 40% del número de células en comparación a la sobre-expresión. Esta disminución de la viabilidad celular fue del 45% en las células SF-295 y del 65% en U-251. Esto se traduce en una disminución del número de células, en comparación al control, del 50% en el caso de SF-295, 60% en U-87 MG y 70% en U-251.



**Figura 13.** Viabilidad celular de las líneas celulares U-251, U-87 MG y SF-295 con sobre-expresión de SMS1 expresada como media y error estándar de la media del porcentaje de células respecto a su control. \*  $p < 0.05$  respecto a control. #  $p < 0.05$  respecto a SMS1.

### 4.2. Viabilidad celular con sobre-expresión de SMS2

Los resultados obtenidos en la determinación de la viabilidad celular en caso de sobre-expresión de la proteína SMS2 se presentan en la figura 14.

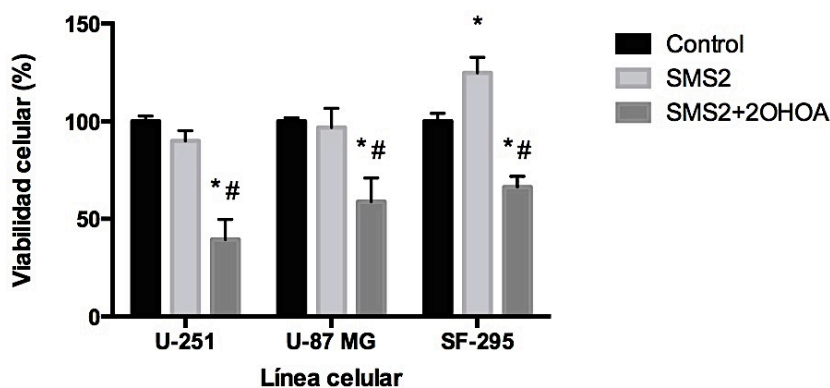
Las células SF-295 experimentaron un aumento significativo de la viabilidad cuando tuvo lugar la sobre-expresión de SMS2, aumentando el número de células en un 25%. En cambio, las líneas celulares U-251 y U-87 MG mostraron una muy leve tendencia a disminuir la viabilidad, aunque ninguna de esas diferencias resultó ser significativa.

La administración de 2OHOA de forma concomitante a la sobre-expresión de la SMS2 resultó en una reducción significativa de la viabilidad celular en las tres líneas, aunque el porcentaje de disminución



del número de células fue diferente en todas ellas. El número de células U-251 disminuyó en aproximadamente un 60%, la línea U-87 MG lo hizo en un 40% y las SF-295, en un 35%.

En comparación a la viabilidad resultante de la sobre-expresión de la SMS2, la adición de 2OHOA supuso una disminución de aproximadamente un 40% del número de células en el caso de U-87 MG y un 45% las SF-295, mientras que la disminución del número de células U-251 como consecuencia de la adición de 2OHOA fue del 55% respecto a la muestra con sobre-expresión de SMS2.

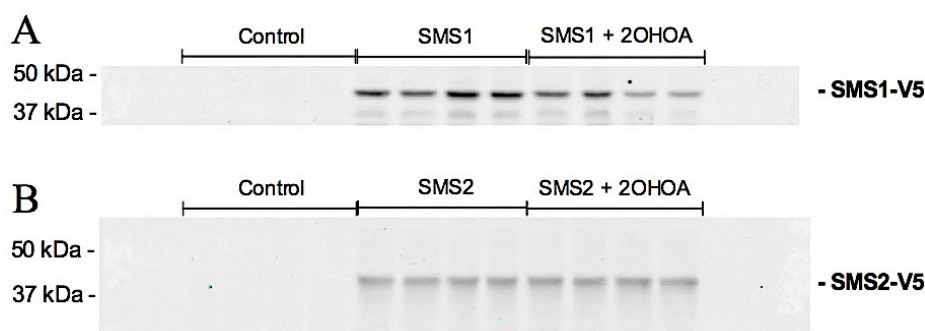


**Figura 14.** Viabilidad celular de las líneas celulares U-251, U-87 MG y SF-295 con sobre-expresión de SMS2 expresada como media y error estándar de la media del porcentaje de células respecto a su control. \*  $p < 0.05$  respecto a control. #  $p < 0.05$  respecto a SMS2.

### 4.3. Confirmación de la sobre-expresión

La efectividad de la sobre-expresión de las distintas isoformas de SMS en todas las muestras usadas en este trabajo para determinar la viabilidad celular fue comprobada mediante Western Blot donde se detectó la presencia del epítipo V5 (véase la figura 15), que formaba parte de la proteína introducida en el plásmido pTRE3G sobre-expresada gracias a la administración de doxiciclina. La expresión de epítopos V5 se observó solamente en aquellas muestras transfectadas con plásmidos pTRE3G portadores de SMS, independientemente de la administración de 2OHOA, con un peso molecular aproximado similar al esperado para la SMS1 y la SMS2 en cada caso. Los controles, que fueron transfectados con un plásmido vacío a partir del cual no podía producirse sobre-expresión alguna, no mostraron expresión de V5 en ninguno de los casos.

Este procedimiento forma parte del Trabajo de Fin de Grado de José Antonio Amengual Rigo, titulado “Análisis de las vías de señalización activadas por efecto de la SMS en células tumorígenicas” (código 4130, Grado de Bioquímica en el curso 2015-2016).



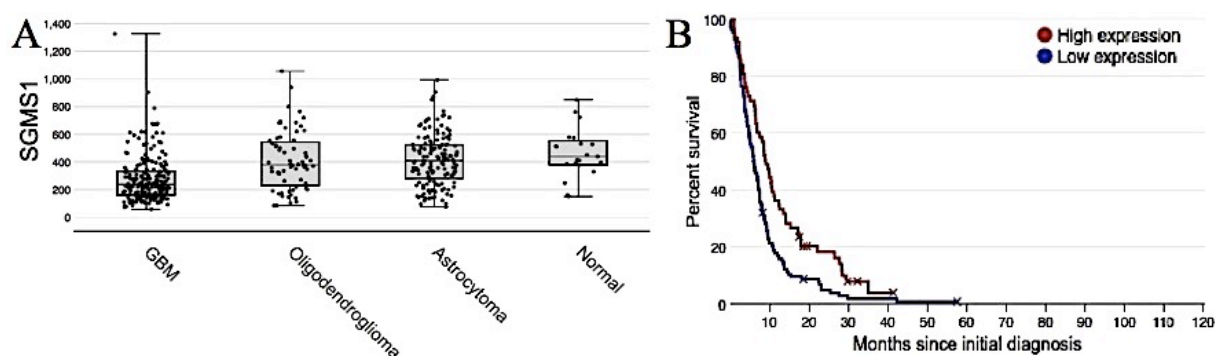
**Figura 15.** Ejemplos representativos de imágenes de Western Blot donde se ha detectado la presencia del epítipo V5 (A) en muestras de sobre-expresión de SMS1 en la línea celular U-87 MG y (B) en muestras de sobre-expresión de SMS2 en la línea celular U-251. Figuras extraídas del Trabajo de Fin de Grado de José Antonio Amengual Rigo (código 4130, Grado de Bioquímica en el curso 2015-2016), con permiso del autor.

## 5. Discusión

El tumor primario del sistema nervioso central más común en los adultos es el glioma maligno [1], en especial el glioblastoma [2]. Éste es el tumor cerebral más severo y con menor tiempo de supervivencia tras el diagnóstico [2,5]. Lamentablemente, el glioblastoma carece de un tratamiento efectivo en la actualidad, por lo que se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas que podrían ser muy prometedoras [2]. Una de éstas es la terapia lipídica de membrana [10], que tiene como objetivo modular la actividad de determinadas proteínas a raíz de un cambio en la estructura o composición lipídica de las membranas celulares [10,12]. El Minerval o ácido 2-hidroxioléico es un ejemplo de fármaco anti-tumoral desarrollado para actuar según el enfoque de la terapia lipídica de membrana que puede constituir un gran avance en el tratamiento de gliomas u otros tumores sólidos [15,16]. El resultado de la administración de 2OHOA consiste en una detención del ciclo celular, cese de la proliferación e inducción de muerte celular [16].

La acción del 2OHOA en las células cancerosas conlleva una activación de la enzima SMS [13], una proteína de membrana con capacidad de sintetizar esfingomiélin a partir de ceramida y fosfatidilcolina [39], por lo que aumenta el contenido de esfingomiélin de las membranas celulares [13,21]. Los estudios que se han realizado hasta el momento revelan que la SMS juega un papel importante en la supervivencia celular [24,32,40,42,46]. Algunos de estos estudios demuestran que el aumento de su actividad puede reducir la proliferación celular [13,24] mientras que otros datos afirman lo contrario [34,36]. Por ello, en este trabajo se ha evaluado el efecto de la sobre-expresión de las proteínas SMS1 y SMS2 sobre la viabilidad celular en diferentes líneas celulares de glioma con el objetivo de determinar cómo afecta cada una de estas proteínas a la proliferación o muerte celular.

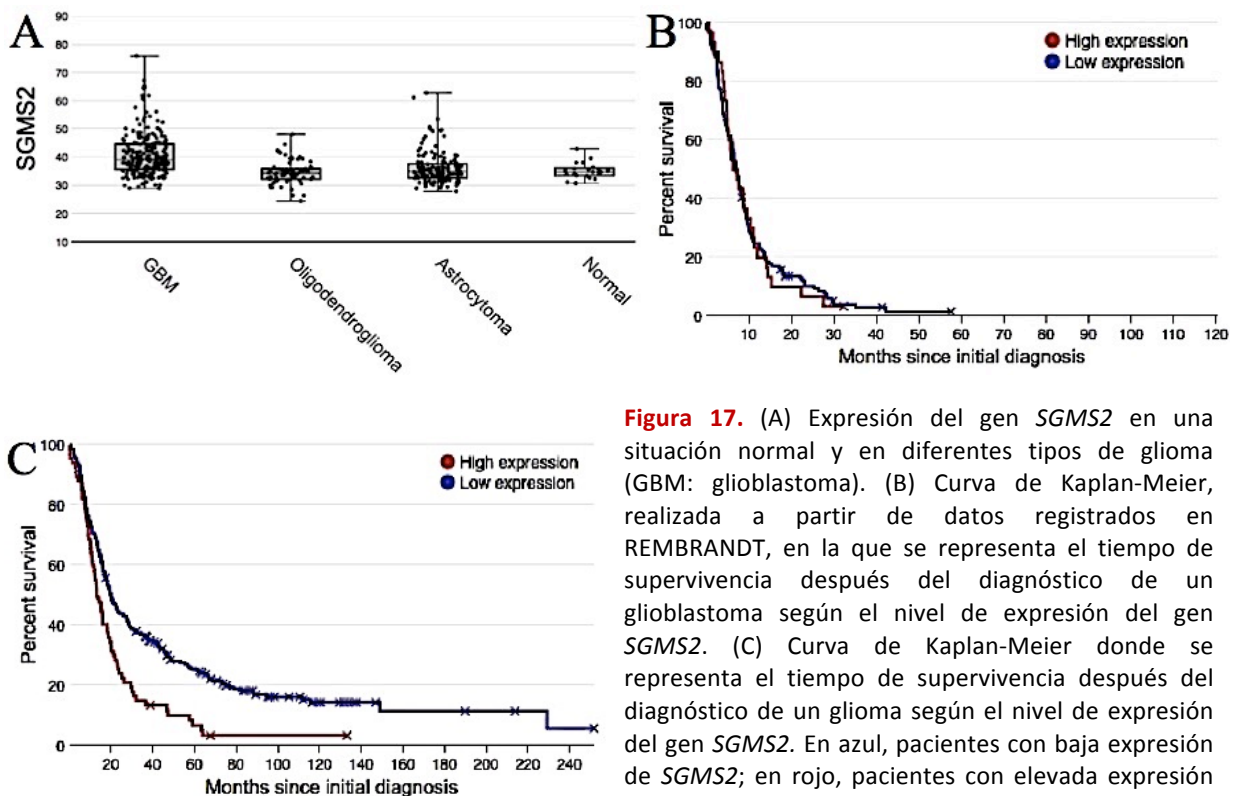
El aumento en la expresión de la SMS1 en las tres líneas celulares de glioma usadas en este trabajo resultó en un descenso en la viabilidad celular de aproximadamente un 20% (véase la figura 13). La SMS1 tiene una expresión media un 44% menor en glioblastoma que en condiciones normales según los datos registrados en la base de datos REMBRANDT (véase la figura 16A) [15,51] y esto se relaciona con una menor supervivencia (véase la figura 16B). Por el contrario, aquellos pacientes de glioblastoma cuya expresión de SMS1 es más elevada presentan una mayor esperanza de vida desde el momento del diagnóstico de su enfermedad [51]. Por tanto, la sobre-expresión de esta enzima puede ser favorable para el pronóstico de un glioma al dificultar la supervivencia de las células tumorales.



**Figura 16.** (A) Expresión del gen *SGMS1* en una situación normal y en diferentes tipos de glioma (GBM: glioblastoma). (B) Curva de Kaplan-Meier, realizada a partir de datos registrados en REMBRANDT, en la que se representa el tiempo de supervivencia después del diagnóstico de un glioblastoma según el nivel de expresión del gen *SGMS1*. En azul, pacientes con baja expresión de *SGMS1*; en rojo, pacientes con elevada expresión de *SGMS1*. Figuras y datos extraídos del repositorio REMBRANDT [51]

La administración de 2OHOA 200  $\mu\text{M}$  a las células de glioma que sobre-expresan la SMS1 produce una disminución mayor de la viabilidad celular, reduciendo el número de células en un 50% o más en función de la línea celular. Es muy posible que la sobre-expresión de SMS1, y por tanto aumento de la actividad esfingomielina sintasa, se vea potenciada por la acción de este fármaco, cuyo mecanismo de acción implica la activación de esta enzima [13].

Los datos referentes a los niveles de expresión del gen *SGMS2* registrados en REMBRANDT muestran un aumento del 13% en los glioblastomas en comparación a una situación normal (véase la figura 17A). La elevada expresión de este gen se refleja en un menor tiempo de supervivencia de los pacientes afectados de un glioma desde el momento de su diagnóstico, aunque este comportamiento no se puede apreciar en el caso concreto del glioblastoma (véanse las figuras 17B y 17C) [51]. Esto último es lo mismo que ocurre cuando se sobre-expresa la SMS2 en U-251 y U-87 MG, pues no se observó ninguna variación significativa en su viabilidad a raíz de la sobre-expresión de esta proteína. Sin embargo, sí que se observó un cambio en la viabilidad de la línea celular SF-295, donde el número de células aumentó un 25% (véase la figura 14). Es muy posible que entre SF-295 y las otras dos líneas celulares analizadas existan diferencias a nivel de expresión de genes o de función de proteínas que puedan estar implicadas en la función de la SMS2 y afecten a la señalización celular que regula la supervivencia de la célula, lo cual podría explicar el diferente efecto de la sobre-expresión de esta proteína sobre la viabilidad de cada una de estas líneas celulares.



**Figura 17.** (A) Expresión del gen *SGMS2* en una situación normal y en diferentes tipos de glioma (GBM: glioblastoma). (B) Curva de Kaplan-Meier, realizada a partir de datos registrados en REMBRANDT, en la que se representa el tiempo de supervivencia después del diagnóstico de un glioblastoma según el nivel de expresión del gen *SGMS2*. (C) Curva de Kaplan-Meier donde se representa el tiempo de supervivencia después del diagnóstico de un glioma según el nivel de expresión del gen *SGMS2*. En azul, pacientes con baja expresión de *SGMS2*; en rojo, pacientes con elevada expresión de *SGMS2*. Figuras y datos extraídos del repositorio REMBRANDT [51].

La adición de 2OHOA 200  $\mu\text{M}$  a las células con sobre-expresión de SMS2 provocó una disminución de la viabilidad en las tres líneas celulares. La reducción del número de células fue menor en SF-295 en comparación a las otras dos líneas celulares analizadas, cosa que puede parecer lógica ya que la sobre-expresión de SMS2 induce la proliferación de estas células pero no de las otras. Este hecho sugiere que la capacidad anti-tumoral del 2OHOA es superior al efecto de la sobre-expresión de SMS2, posiblemente debido a efectos más allá de la activación de la actividad SMS [14,15].

La sobre-expresión de SMS implica un incremento de la actividad celular esfingomielina sintasa, que se acompaña de una acumulación de esfingomielina en la membrana plasmática [24]. El cambio en la composición lipídica de las membranas celulares tendrá efectos sobre la actividad de algunas vías de señalización celular. El incremento de la presencia de esfingomielina en la membrana plasmática provoca un aumento del orden y compactación de los dominios de membrana  $l_o$  [14], lo que conduce a la expulsión de la proteína Ras de la membrana plasmática y la consiguiente inactivación de las vías MAPK y PI3K/Akt [16], provocando una disminución en dos vías de señalización inductoras de proliferación celular [22]. El aumento de actividad esfingomielina sintasa también implica un aumento en el contenido celular de ceramida y 1,2-diacilglicerol [21,24]. La acumulación de ceramida, una molécula inhibidora de la proliferación celular e inductora del proceso apoptótico [33,35,37], desencadenará diferentes respuestas celulares, como por ejemplo la desfosforilación e inactivación de proteínas como pRb y Akt [33,35,36]. Todo ello debería conducir a una reducción de la proliferación celular [33,35]. El 2OHOA se incorpora a las membranas celulares y provoca cambios estructurales y de composición en ellas [13,14] que resultan en una activación de la SMS [13,15,16], aumentando el contenido de esfingomielina y ceramida, por lo que el efecto de este fármaco debería iniciar respuestas celulares como las que se acaban de describir. Los efectos del Minerval implican una activación moderada de PKC $\alpha$  a través de la remodelación de la membrana plasmática [16,17] y del aumento del contenido de 1,2-diacilglicerol [24], lo cual puede competir con la inactivación de ésta que ejerce la ceramida y contribuir a una mayor disminución de la viabilidad celular.

Tanto la SMS1 como SMS2 contribuyen a la síntesis de esfingomielina, aunque la primera lo hace en mayor cantidad [42], y la sobre-expresión de cualquiera de ellas provoca cambios globales similares en cuanto al contenido de esfingolípidos de las membranas celulares [24]. Por este motivo, se podría esperar que la viabilidad celular resultado de la sobre-expresión de SMS1 y SMS2 se viera afectada por igual en ambos casos. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo tras la sobre-expresión de SMS2 en diferentes líneas de glioma no revelan los mismos cambios en la viabilidad celular que se observaron en el caso de la sobre-expresión de SMS1.

La localización diferencial de SMS1 y SMS2 podría hacer que cada una de ellas tenga un papel único y distintivo en la regulación de la proliferación o muerte celular. Se sabe que existen diferentes *pools* de ceramida en la célula, según la procedencia y localización de esta molécula, que no necesariamente se comportan de la misma manera en los eventos de señalización pues pueden tener diferentes dianas moleculares [35,38]. Posiblemente, la acumulación de ceramida en distintas membranas celulares conlleve la modulación de la actividad de diferentes proteínas, lo que desencadenará respuestas celulares potencialmente distintas [37]. Al localizarse en el aparato de Golgi, la SMS1 podría actuar sintetizando ávidamente esfingomielina a partir de la ceramida procedente del retículo endoplasmático a través de la proteína transportadora de ceramida (CERT) [35,31] para impedir que el *pool* metabólico de este esfingolípido alcance la membrana plasmática [20,31]. En cambio, la actividad catalítica de la SMS2 en la membrana plasmática no depende del transporte de ceramida mediado por CERT [31]. Por eso se piensa que el papel de la SMS2 en la membrana plasmática tiene un efecto más dirigido a la regulación del contenido de ceramida y de 1,2-diacilglicerol procedentes de la degradación de otros lípidos más complejos [20,34,31], por ejemplo la liberación de ceramida por acción de las esfingomielinasas [34,31]. Estas moléculas ejercen un relevante papel en la regulación de la proliferación y muerte celular desde la membrana plasmática [35]. Así, la acción de la SMS2 podría evitar consecuencias no deseadas sobre la supervivencia celular convirtiendo la ceramida de nuevo en esfingomielina [20]. La sobre-expresión de SMS1 y de SMS2 implica un aumento de la actividad esfingomielina sintasa en distintas localizaciones celulares, por lo que se pueden ver afectados diferentes *pools* de ceramida cuyas efectos sobre la supervivencia celular no son los mismos.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la SMS1 y SMS2 tienen la capacidad de catalizar varias reacciones: la síntesis de esfingomielina a partir de ceramida y fosfatidilcolina, así como su degradación [39], y la síntesis de CPE a partir de ceramida y fosfatidiletanolamina [46]. Por tanto, es posible que la SMS1 y la SMS2 tengan diferentes preferencias de sustratos para realizar su función enzimática, lo que podría dar lugar a cambios diferentes en la composición lipídica de las distintas membranas y afectar así a los procesos de señalización celular que regulan la proliferación. Es más, es posible que la sobre-expresión de SMS conlleve la catálisis de una determinada reacción enzimática mientras que la administración de 2OHOA pueda potenciar otra reacción, ya que se ha observado que la sobre-expresión de SMS1 y SMS2 en células CHO no supone cambios en el contenido celular de fosfatidilcolina [24] pero el efecto del Minerval en células de glioma implica una disminución de los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina [13]. Esto podría contribuir a la explicación de la mayor reducción de la viabilidad provocada por el fármaco en comparación con las células que solamente sobre-expresan estas enzimas.

Tampoco hay que descartar la posibilidad de que la SMS1 y SMS2 tengan diferente capacidad de interacción con otras proteínas celulares, de forma que podrían regular la actividad de éstas para modificar así la supervivencia celular, o por el contrario, otras proteínas celulares podrían regular la actividad enzimática de la SMS1 y la SMS2. Un ejemplo que fundamenta esta hipótesis es la presencia del dominio SAM en la SMS1, de función todavía desconocida, y su ausencia en SMS2 [34]. Ya que el dominio SAM de SMSr es esencial para su función reguladora de la homeóstasis de la ceramida [45], el dominio SAM de la SMS1 también podría estar implicado en la regulación de la actividad de esta proteína. Se sabe que los dominios SAM tienen capacidad de interactuar con dominios de otras proteínas, como por ejemplo dominios SH2, comunes en proteínas implicadas en procesos de transducción de señal [20] tales como la proteína GRB2 iniciadora de la vía MAPK [22]. Por tanto, la presencia del dominio SAM podría implicar a la SMS1 de forma directa en la regulación de la proliferación celular.

Asimismo, la regulación de la expresión génica del gen *SGMS1* es compleja, pues se han descrito varios promotores alternativos, distintas formas de *splicing* del mRNA de este gen y varios sitios de poliadenilación alternativos. El resultado de tan elevada complejidad es un conjunto de 16 mRNA distintos procedentes de un mismo gen que se expresan de forma diferente según el tejido [47]. Algunas variantes de estos transcritos contienen la información genética para la síntesis de la proteína SMS1 completa, mientras que otros mRNA codifican formas truncadas de ésta que carecen de centro activo [47]. Estas formas incompletas de SMS1 así como los diferentes transcritos que pueden proceder del gen *SGMS1* pueden estar implicados en la regulación de la expresión génica de esta proteína. Tal magnitud de complejidad puede inducir a pensar que la SMS1 puede tener un papel en el funcionamiento celular que va más allá de su función catalítica.

## 6. Conclusiones

Al principio de este trabajo se plantearon dos objetivos:

1. Evaluar las posibles diferencias en la viabilidad celular como consecuencia de la sobre-expresión de SMS1 o SMS2 en diferentes células de glioma mediante contaje manual.

La sobre-expresión de SMS1 y SMS2 no mostró los mismo efectos sobre la viabilidad de las tres líneas celulares de glioma analizadas en este trabajo. Mientras que en los tres casos de sobre-expresión de SMS1 se produjo un descenso significativo de la viabilidad celular, solamente un caso de sobre-expresión de SMS2 resultó en un cambio significativo de la viabilidad celular, que aumentó.

2. Evaluar el efecto sobre la proliferación celular que ejerce la sobre-expresión de SMS1 o SMS2 en combinación con la administración de 2OHOA en las mismas líneas celulares mediante contaje manual.

La administración de 2OHOA 200  $\mu$ M a células de glioma que sobre-expresan cualquiera de las dos isoformas de SMS estudiadas provoca un descenso significativo de la viabilidad celular. Este fármaco puede potenciar el efecto beneficioso de la sobre-expresión de SMS1 o bien contrarrestar el efecto perjudicial de la sobre-expresión de SMS2.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que la SMS puede tener un papel destacable en la supervivencia de células de glioma ya que se ha visto alterada la viabilidad celular como consecuencia de su sobre-expresión. Sin embargo, su actuación concreta todavía no se ha esclarecido pues no se han podido resolver muchas de las incógnitas que rodean la función de estas proteínas, como por ejemplo cómo se regula la función enzimática de la SMS y qué preferencias de sustratos tiene cada isoforma, qué papel tienen las formas truncadas de SMS1 en el funcionamiento celular o en la regulación de la síntesis y degradación de esfingomielina, o cuáles son las proteínas que interactúan con el dominio SAM de SMS1. Son muchas las cuestiones que no tienen respuesta, por lo que no debe dejar de investigarse el funcionamiento y la regulación de la SMS ya que pueden constituir un punto relevante de la homeóstasis celular y regulación de la supervivencia. Es posible que la esfingomielina sintasa tenga un papel en la célula que vaya más allá de su función enzimática.

*Agradecimientos.* Quisiera agradecer a los miembros del grupo de Biomedicina Molecular y Celular todo el apoyo y ayuda que me han ofrecido durante la realización de este trabajo de este proyecto. En especial, quiero darle las gracias a mi tutor, el Dr. Pablo Escribá Ruiz, por ofrecerme sus consejos a lo largo del desarrollo de este trabajo de fin de grado, y a la Dra. Paula Fernández García por enseñarme las técnicas y procedimientos aplicados en este trabajo y por haber tenido siempre un momento para dar respuesta a las preguntas e inquietudes que me han surgido durante el desarrollo del trabajo experimental y la redacción de esta memoria.



## 7. Referencias

- 1 Louis, D.N. (2006) Molecular Pathology of Malignant Gliomas. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1, 97-117
- 2 Adamson, C. *et al.* (2009) Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1061-1083
- 3 Ohgaki, H. y Kleihues, P. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170, 1445-53
- 4 Louis, D.N. *et al.* (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114, 97-109
- 5 Maher, E.A. *et al.* (2001) Malignant glioma: Genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15, 1311-1333
- 6 Escribá, P. V. *et al.* (2008) Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies: Translational Medicine. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 829-875
- 7 Goñi, F.M. (2014) The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1467-76
- 8 van Meer, G. *et al.* (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112-124
- 9 Frolov, V.A. *et al.* (2011) Lipid Polymorphisms and Membrane Shape. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004747
- 10 Escribá, P. V. (2006) Membrane-lipid therapy: A new approach in molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 12, 34-43
- 11 Lee, A.G. (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1666, 62-87
- 12 Escribá, P. V. *et al.* (2015) Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog. Lipid Res.* 59, 38-53
- 13 Barcelo-Coblijn, G. *et al.* (2011) Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 19569-19574
- 14 Martin, M.L. *et al.* (2013) The role of membrane fatty acid remodeling in the antitumor mechanism of action of 2-hydroxyoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1828, 1405-1413
- 15 Lladó, V. *et al.* (2014) Regulation of the cancer cell membrane lipid composition by NaChOleate: Effects on cell signaling and therapeutical relevance in glioma. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 1619-1627
- 16 Teres, S. *et al.* (2012) 2-Hydroxyoleate, a nontoxic membrane binding anticancer drug, induces glioma cell differentiation and autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8489-8494
- 17 Martinez, J. *et al.* (2005) Membrane Structure Modulation, Protein Kinase Ca Activation, and Anticancer Activity of Minerval. *Mol. Pharmacol.* 67, 531-540
- 18 Llado, V. *et al.* (2010) Minerval induces apoptosis in Jurkat and other cancer cells. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 659-670
- 19 Ibarguren, M. *et al.* (2014) The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1518-28
- 20 Tafesse, F.G. *et al.* (2006) The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem.* 281, 29421-29425
- 21 Martin, M.L. *et al.* (2013) Sustained activation of sphingomyelin synthase by 2-hydroxyoleic acid induces sphingolipidosis in tumor cells. *J. Lipid Res.* 54, 1457-65
- 22 De Luca, A. *et al.* (2012) The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* 16, S17-S27
- 23 Ibarguren, M. *et al.* (2013) Partitioning of liquid-ordered/liquid-disordered membrane microdomains induced by the fluidifying effect of 2-hydroxylated fatty acid derivatives. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1828, 2553-2563
- 24 Ding, T. *et al.* (2008) SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. *J. Lipid Res.* 49, 376-85

- 25 Martínez, J. *et al.* (2005) The repression of E2F-1 is critical for the activity of Minerval against cancer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 466-474
- 26 Griner, E.M. y Kazanietz, M.G. (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 281-94
- 27 Lladó, V. *et al.* (2009) Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13754-13758
- 28 Miyaji, M. *et al.* (2005) Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 202, 249-259
- 29 Marcilla-Etxenike, A. *et al.* (2012) 2-Hydroxyoleic Acid Induces ER Stress and Autophagy in Various Human Glioma Cell Lines. *PLoS One* 7, e48235
- 30 Wu, W.K.K. *et al.* (2012) The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene* 31, 939-953
- 31 Slotte, J.P. (2013) Biological functions of sphingomyelins. *Prog. Lipid Res.* 52, 424-437
- 32 Li, Z. *et al.* (2007) Inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) affects intracellular sphingomyelin accumulation and plasma membrane lipid organization. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 1186-1194
- 33 Hannun, Y.A. y Obeid, L.M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139-50
- 34 Taniguchi, M. y Okazaki, T. (2014) The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration - From cell and animal models to human disorders. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841, 692-703
- 35 Ogretmen, B. y Hannun, Y. a (2004) Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* 4, 604-616
- 36 Modrak, D.E. *et al.* (2006) Sphingolipid targets in cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* 5, 200-208
- 37 Gulbins, E. y Kolesnick, R. (2003) Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 22, 7070-7
- 38 Reynolds, C.P. *et al.* (2004) Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett.* 206, 169-180
- 39 Huitema, K. *et al.* (2004) Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 23, 33-44
- 40 Yamaoka, S. *et al.* (2004) Expression Cloning of a Human cDNA Restoring Sphingomyelin Synthesis and Cell Growth in Sphingomyelin Synthase-defective Lymphoid Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 18688-18693
- 41 Yeang, C. *et al.* (2008) The domain responsible for sphingomyelin synthase (SMS) activity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1781, 610-617
- 42 Tafesse, F.G. *et al.* (2007) Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 282, 17537-17547
- 43 Tani, M. y Kuge, O. (2009) Sphingomyelin synthase 2 is palmitoylated at the COOH-terminal tail, which is involved in its localization in plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 328-332
- 44 Vacaru, A.M. *et al.* (2009) Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER. *J. Cell Biol.* 185, 1013-1027
- 45 Tafesse, F.G. *et al.* (2014) Sphingomyelin synthase-related protein SMSr is a suppressor of ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J. Cell Sci.* 127, 445-54
- 46 Ding, T. *et al.* (2015) All members in the sphingomyelin synthase gene family have ceramide phosphoethanolamine synthase activity. *J. Lipid Res.* 56, 537-45
- 47 Rozhkova, A. V. *et al.* (2011) Human sphingomyelin synthase 1 gene (SMS1): Organization, multiple mRNA splice variants and expression in adult tissues. *Gene* 481, 65-75
- 48 Felgner, P.L. *et al.* (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7413-7
- 49 Gossen, M. *et al.* (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 268, 1766-1769
- 50 Zhu, Z. *et al.* (2002) Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 121-128
- 51 Glioma Molecular Diagnostic Initiative (2005), REMBRANDT Database. [Online]. Available: <http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt/>. [Accessed: 12-may-2016]