

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE SENSORES FLUORESCENTES ANÁLOGOS A
ESFINGOMIELINA PARA IDENTIFICAR INTERACCIONES
QUIMIOTERAPÉUTICAS BASADAS EN MECANISMOS AUTOFÁGICOS

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en
Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y título de
Maestría Académica en Microbiología

SUSANA MARÍA MESÉN PORRAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

DEDICATORIA

A mi mamá, Marita Porras, mi motor de vida desde siempre. A mi hermano Esteve Mesén, quien ha sido mi modelo a seguir y quien me inspiró para perseguir los caminos del apasionante mundo de la ciencia.

A mi papá Ronny Mesén, a mis abuelitos Bernardo Porras y Elia Estrada, a mi padrino Nelson Hernández y a mi querida tía Daisy Porras, quienes me dejaron profundas cicatrices al partir y desde entonces me acompañan como estrellas.

“Era como si se me abriera un mundo nuevo, el mundo de la ciencia, que por fin se me permitía conocer con toda libertad”

-Marie Curie-

AGRADECIMIENTOS

Al concluir esta etapa, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a quienes han sido fundamentales en la realización de esta tesis.

Agradezco primeramente a Dios por permitirme la salud, la guía, las capacidades y la serenidad para llegar hasta este punto académico tan importante de mi vida. A mi mamá, quien se ha esforzado todos los días de su vida por darnos lo mejor que ha podido y por haber arado mi camino para que mi esfuerzo fuera enfocado. A mi hermano, Esteve Mesén, por siempre ayudarme y animarme, con su ejemplo me ha motivado a culminar este proceso académico de forma exitosa.

A Daniel Sánchez, quien ha sido mi constante apoyo emocional para llegar hasta aquí y continuar creciendo. Su confianza en mis capacidades, paciencia y amor, han sido vitales para superar los desafíos presentados. A él y a toda su estimable familia, mi sincero agradecimiento.

A mis amigas, Amanda Villalobos, Karol Aguilar y Diana Bravo, por estar en medio de este proceso de formación, les agradezco por ser la mejor compañía que me pudo dejar la UCR.

Agradezco a mi supervisora del Instituto Clodomiro Picado, Ph.D. María Herrera Vega, quien me animó a estudiar esta línea de investigación y me dio herramientas y confianza en mis habilidades y, a la Ph.D. Mariángela Vargas, quien siempre ha tenido la mejor disposición de ayudarme; sin duda, ellas fueron enormes ejemplos para mi formación.

Agradezco de forma especial al director del LANOTEC, Ph.D. José Roberto Vega Baudrit, quien ha impulsado mi crecimiento profesional, me ha permitido participar en eventos internacionales y me ha dado el espacio para culminar con éxito este gran paso profesional en mi carrera.

A mis lectores de tesis, Ph.D. José Molina Mora y M.Sc. Mario Masís Mora, quiero expresar mi sincero agradecimiento por su orientación experta, su atinente ayuda y su siempre buena disposición durante todo el proceso de investigación.

Además, quiero expresar un sentido agradecimiento a mi profesor tutor, Dr. Rodrigo Mora, quien siempre ha estado para compartir su conocimiento conmigo, quien me ha preparado para el futuro como profesional y quien me abrió las puertas de su grupo de investigación para mostrarme la multidisciplinariedad, como eje fundamental del crecimiento. Le agradezco el privilegio de trabajar en su equipo de investigación y le agradezco por toda su ayuda y orientación para incluirme en los campos científicos de mi interés y por todos sus consejos y orientación para continuar con mi próximo paso profesional.

A mi institución y a todo el personal administrativo y académico que ha contribuido al desarrollo de este programa de maestría, de forma especial al Ph.D. Carlos Chacón y a doña Virginia Carmona, por su colaboración fundamental en el proceso de estudio, las oportunidades brindadas y el ambiente académico estimulante.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que, de manera directa o indirecta, han participado en mi formación. Cada uno ha dejado una huella significativa en mi camino.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.



PhD. Carlos Chacón Díaz
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



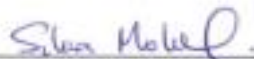
PhD. Rodrigo Mora Rodríguez
Director de Tesis



PhD. José Arturo Molina Mora
Asesor



M.Sc. Mario Alberto Masís Mora
Asesor



PhD. Silvia Molinā Castro

**Representante del Director del Programa de Posgrado en Microbiología,
Parasitología, Química Clínica e Inmunología**



Susana María Mesén Porras
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	vi
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Cáncer: generalidades y estadísticas.....	3
2.2 Cáncer de pulmón y mama: características.....	7
2.2.1 Cáncer de pulmón	7
2.2.1 Cáncer de mama.....	9
2.3 Membranas celulares	13
2.3.1 Estructura y función de las membranas celulares	13
2.3.2 Organización celular	15
2.3.3 Vía secretora	16
2.3.4 Vía endocítica	18
2.4 La vía de los esfingolípidos	20
2.4.1 Síntesis <i>de novo</i>	24
2.4.2 Vía residual (<i>salvage pathway</i>).....	25
2.5 Inhibidores de la vía de los esfingolípidos: Uso clínico	29
2.6 Resistencia a la quimioterapia y esfingolípidos.....	35

2.7 Esfingolípidos con sonda BODIPY	39
2.8 Autofagia y su relación con el metabolismo de esfingolípidos	42
2.9 Usos del marcador de autofagia LC3-GFP-m-Cherry en la investigación de terapias contra el cáncer	46
CAPÍTULO III. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	47
3.1 Justificación del Proyecto de Investigación.....	47
3.2 Objetivos	48
3.2.1 Objetivo General.....	48
3.2.2 Objetivos Específicos	48
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS	50
4.1 Cultivos celulares.....	50
4.1.1 A549 <i>wild-type</i> (A549 – WT).....	50
4.1.2 MCF-7 <i>wild-type</i> (MCF-7– WT)	50
4.2 Preparación de las células de cáncer con la tinción fluorescente SM-BOD	51
4.2.1 Siembra de células de cáncer de mama y pulmón (MCF-7– WT y A549 – WT).....	51
4.2.2 Medio de tinción	51
4.2.3 Medio de lectura	51
4.2.4 Tratamientos y controles.....	52
4.3 Evaluación del metabolismo de SM-BOD con células A549– WT y MCF-7– WT... ..	53
4.4 Topología modelo para el destino metabólico de SM-BOD.....	53
4.5 Ensamblaje del vector retroviral mCherry-EGFP-LC3B.....	54
4.6 Generación y clasificación de la línea celular estable A549 mCherry-EGFP-LC3B y MCF-7 mCherry-EGFP-LC3B (A549 – LC3/m-Cherry y MCF-7 – LC3/m-Cherry)	55
4.7 Evaluación experimental del proceso autofágico de las células estables A549 – LC3/m- Cherry	55
CAPÍTULO V. RESULTADOS	56

5.1 La quimioterapia interactúa con moduladores de la autofagia e inhibidores de la vía de los esfingolípidos para modificar la citotoxicidad.	56
5.2 Un modelo de mezclas Gaussianas de perfiles de heterogeneidad del destino metabólico de un análogo de esfingomielina fluorescente sugiere la base mecanicista de las interacciones mapeadas en la vía de esfingolípidos.	63
5.3 Células estables marcadas con mCherry-EGFP-LC3B y SM-BOD, muestran que las interacciones de EPI con TOR y RAP estimulan la acumulación de autofagosomas.	67
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
7.1 Conclusiones	76
7.2 Recomendaciones	77
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
SOBRE ESTA TESIS	98
CAPÍTULO IX. ANEXOS	99
Anexo 1: Identificación de las principales quimioterapias con efectos sinérgicos en las líneas celulares A549 y MCF-9	99
Anexo 2: Diseño del protocolo de reconocimiento de imágenes (pipeline) para la evaluación de la sonda fluorescente SM-BOD en las líneas celulares A549– WT y MCF-7– WT.	101
Anexo 3: Diseño del protocolo de reconocimiento de imágenes (pipeline) para la evaluación del flujo autofágico en las líneas celulares estables A549– LC3/m-Cherry y MCF-7– LC3/m-Cherry.	103
Anexo 4: Síntesis de un esfingolípidos bifuncional de ácido graso (pacFA) para comparar su funcionalidad en el metabolismo de esfingolípidos con la sonda fluorescente SM-BOD	105
Anexo 5: Participación en el congreso <i>FEBS Special Meeting, Sphingolipids Biology: the dawn of a new era</i> , que tuvo lugar en la Isla de Madeira, Portugal, del 8 al 13 de Octubre, 2023.	107

Anexo 6: Participación en el congreso <i>Gordon Research Seminar</i> (GRS - presentando un <i>Short Talk</i>) y <i>Gordon Research Conference</i> (GRC - presentando un <i>poster</i>), que tuvo lugar en Galveston, Texas, EE.UU, del 17 al 23 de Febrero, 2024.	109
Anexo 7: Participación en el congreso <i>XV Sphingolipid Club Meeting</i> , que tuvo lugar en Erlangen, Alemania, del 3 al 7 de Setiembre, 2024.....	113
Anexo 8: Artículo científico publicado “Sphingolipid-based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells” con los resultados de la tesis, en la revista <i>Cells</i> , en Noviembre 2023 (DOI: https://doi.org/10.3390/cells12222588).....	116

RESUMEN

La heterogeneidad tumoral conduce a la resistencia a la quimioterapia en el tratamiento del cáncer; así, los esfingolípidos tienen un rol fundamental en el destino celular y la señalización del estrés.

En este proyecto de tesis, se analiza el metabolismo de los esfingolípidos y el flujo autofágico para estudiar las interacciones quimioterapéuticas en el modelo celular de cáncer de pulmón (A549) y de mama (MCF-7).

Se utilizaron células cargadas con un análogo de esfingomiélin fluorescente (BODIPY) y una sonda para rastrear el flujo autofágico (mCherry-EGFP-LC3B), con el fin de evaluar la citotoxicidad cuando las células se exponen a quimioterapia (epirrubicina, cisplatino y paclitaxel) junto con inhibidores de la vía de los esfingolípidos y moduladores de la autofagia.

Las células de cáncer de mama MCF-7 no lograron mostrar internalización del análogo fluorescente, por lo que se determinó que los resultados restantes del proyecto se iban a generar únicamente basados en las células A549.

El enfoque de modelo celular se basó en biosensores de esfingolípidos fluorescentes y un modelo matemático de mezclas Gaussianas (GMM) del perfil de heterogeneidad celular para mapear la influencia de la quimioterapia en la vía de los esfingolípidos e inferir posibles interacciones sinérgicas.

Los resultados mostraron sinergias significativas, especialmente cuando se combina la quimioterapia epirrubicina con inductores de autofagia (rapamicina y torin), lo que reduce la viabilidad celular. El cisplatino, otro fármaco quimioterapéutico, también tuvo sinergia con un inhibidor de la ceramidasa. Por su parte, el agente anti-cáncer paclitaxel mostró principalmente efectos antagónicos.

El modelo de mapeo planteado sugiere que la combinación de quimioterapias con inductores de autofagia aumenta la formación de vesículas, posiblemente relacionadas con la

acumulación de ceramida, lo que desencadena la muerte celular. Sin embargo, el modelo *in silico* propuso la acumulación de ceramida en los autofagosomas, y el análisis cinético experimental proporcionó evidencia de colocación de esfingolípidos en los autofagosomas. Es por lo anterior que, se requieren más estudios para identificar los esfingolípidos específicos que se acumulan en los autofagosomas.

Estos hallazgos ofrecen información sobre estrategias potenciales para superar la resistencia a la quimioterapia dirigidos a la vía de los esfingolípidos.

Palabras clave: cáncer; vía de los esfingolípidos; BODIPY; LC3/m-Cherry; sinergismos; autofagia.

ABSTRACT

Tumor heterogeneity leads to drug resistance in cancer treatment with the crucial role of sphingolipids in cell fate and stress signaling. This thesis aimed to analyze the sphingolipid metabolism and autophagic flux to study chemotherapeutic interactions on the A549 lung cancer model and MCF-7 breast cancer model.

Loaded cells with fluorescent sphingomyelin analog (BODIPY) and mCherry-EGFP-LC3B were used to track autophagic flux and assess cytotoxicity when cells are exposed to chemotherapy (epirubicin, cisplatin, and paclitaxel) together with sphingolipid pathway inhibitors and autophagy modulators.

The MCF-7 breast cancer cells failed to show internalization of the fluorescent analog; thus, it was determined that the subsequent results of the project were going to be generated based on the A549 cells only.

The cell model approach employed fluorescent sphingolipid biosensors and a Gaussian Mixture Model of cell heterogeneity profiles to map the influence of chemotherapy on the sphingolipid pathway to infer potential synergistic interactions.

Results showed significant synergy, especially when combining epirubicin with autophagy inducers (rapamycin and torin), reducing cell viability. Cisplatin also synergized with a ceramidase inhibitor. However, paclitaxel often led to antagonistic effects.

The mapping model proposed, suggests that combining chemotherapies with autophagy inducers increases vesicle formation, possibly linked to ceramide accumulation, triggering cell death. However, the *in silico* model proposed ceramide accumulation in autophagosomes, and kinetic analysis provided evidence of sphingolipid colocalization in autophagosomes. Further research is needed to identify specific sphingolipids accumulating in autophagosomes.

These findings offer insights into potential strategies for overcoming chemotherapy resistance by targeting the sphingolipid pathway.

Keywords: cancer; sphingolipids pathway; BODIPY; LC3/m-Cherry; synergisms; autophagy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de incidencia y mortalidad del cáncer	6
Figura 2. Principales características del cáncer de pulmón	8
Figura 3. Tipos principales de cáncer de mama.....	11
Figura 4. Conformación estructural de las membranas celulares	14
Figura 5. Vía secretoria para esfingolípidos	18
Figura 6. Vías de entrada a la célula.....	19
Figura 7. Estructura de los esfingolípidos (SL) más relevantes	20
Figura 8. Rutas metabólicas y los sitios intracelulares donde ocurren algunas de reacciones de interconversión de esfingolípidos	22
Figura 9. Metabolismo de los esfingolípidos (SL) a nivel celular.....	23
Figura 10. Vía metabólica de esfingolípidos (SL) mediados por la síntesis <i>de novo</i> y la vía residual (<i>salvage pathway</i>)	26
Figura 11. Modelo matemático del destino metabólico de un análogo de esfingomielina (SM) marcado con sonda BODIPY (SM-BOD)	27
Figura 12. Estructura química de los principales esfingolípidos (SL) con funciones bioactivas de muerte y supervivencia celular	37
Figura 13. Reóstato de esfingolípido	38
Figura 14. Estructura del análogo de esfingomielina fluorescente (SM-BOD).....	41
Figura 15. Esquema general de la (macro) autofagia en eucariotas	43
Figura 16. Rastreo del flujo autofágico con <i>double-tagged</i> LC3B.....	45
Figura 17. Ensayo cinético de la intensidad fluorescente contra el tiempo de reacción de la sonda fluorescente SM-BOD para las líneas celulares A549 y MCF-7	57
Figura 18. Análisis de viabilidad celular a las 48 h de la línea celular A549 – WT permite el reconocimiento de interacciones quimioterapia-inhibidor	60

Figura 19. Análisis de imágenes para la segmentación subcelular (núcleos/citoplasmas) del modelo de células de cáncer de pulmón (A549 – WT).....	62
Figura 20. Modelo de mezclas Gaussianas (GMM) permite la asociación de perturbaciones, como potencial explicación de las interacciones sinérgicas reportadas	64
Figura 21. Topología modelo para la línea celular de cáncer de pulmón A549–WT del destino metabólico de un análogo de esfingomielina fluorescente (SM-BOD) en conjunto con el proceso autofágico	66
Figura 22. Análisis experimental para evidenciar el proceso autofágico, mediante el incremento en el contenido de autofagosomas (AP) en las condiciones sinérgicas seleccionadas a las 24 h para las células estables A549 mCherry-EGFP-LC3B (A549 LC3/m-Cherry), mediante microscopía de fluorescencia.....	68
Figura 23. Análisis de viabilidad celular para la línea celular de cáncer de mama (MCF-7 – WT) para la determinación de las principales quimioterapias con efectos sinérgicos inductores de muerte celular	99
Figura 24. Análisis de viabilidad celular para la línea celular de cáncer de pulmón (A549 – WT).....	100
Figura 25. <i>Pipeline</i> general para la evaluación de la sonda fluorescente SM-BOD en las líneas celulares A549 – WT y MCF – 7. Fuente: extraído del <i>pipeline</i> elaborado en el <i>software</i> CellProfiler.....	101
Figura 26. <i>Pipeline</i> detallado para la evaluación de la sonda SM-BOD en la línea celular de cáncer de pulmón A549– WT.....	102
Figura 27. <i>Pipeline</i> general para la evaluación del flujo autofágico en las líneas celulares estables A549– LC3/m-Cherry y MCF-7– LC3/m-Cherry. Fuente: extraído del <i>pipeline</i> elaborado en el <i>software</i> CellProfiler.	103
Figura 28. <i>Pipeline</i> detallado para la evaluación de la citotoxicidad mediada por autofagia, marcado con LC3/m-Cherry en la línea celular de cáncer de pulmón A549.....	104
Figura 29. Reacción de click para la formación de esfingolípidos bifuncionales	105

LISTA DE ABREVIATURAS

A549: Línea celular de carcinoma de pulmón.

ACI: Inhibidor de la ceramidasa ácida (del inglés: *Acid ceramidase inhibitor*).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AL: Autofagolisosoma (del inglés: *Autophagolysosome*).

AP: Autofagosoma (del inglés: *Autophagosome*).

aSMasa: Esfingomielinasa ácida (del inglés: *Acid Sphingomyelinase*).

ATP: Adenosín trifosfato (del inglés: *Adenosine triphosphate*).

ATX: Autotaxina (del inglés: *Autotaxin*).

BOD: Fluoróforo BODIPY (del inglés: *Boron-dipyrrromethene*).

C1P: Ceramida 1- fosfato (del inglés: *Ceramide-1-phosphate*).

Cer: Ceramida (del inglés: *Ceramide*).

CerK: Ceramida quinasa (del inglés: *Ceramide kinase*).

CerS: Ceramida sintasa (del inglés: *Ceramide synthase*).

CERT: Proteína de transferencia de ceramida (del inglés: *Ceramide transport protein from Endoplasmic Reticulum*).

CIIC: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer.

CIS: Cisplatino (del inglés: *Cisplatin*).

CKI: Inhibidor de ceramida quinasa (del inglés: *Ceramide Kinase Inhibitor*).

CLIC: Transportadores independientes de clatrina y dinamina (del inglés: *clathrin- and dynamin-independent carriers*).

CoA: Coenzima-A.

DAMP: Patrones moleculares asociados al daño (del inglés: *Damage-Associated Molecular Patterns*).

D609: Inhibidor de esfingomielina sintasa (del inglés: *Sphingomyelin synthase inhibitor*).

DAPI: Tinción nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (del inglés: *4',6-diamidino-2-phenylindole*).

DCIS: Carcinoma Ductal *In Situ* (del inglés: *Ductal Carcinoma In Situ*).

Des: Desipramina, inhibidor de la esfingomielinasa ácida y ceramidasa ácida (del inglés: *Desipramine, acid sphingomyelinase and acid ceramidase inhibitor*).

EE.UU: Estados Unidos (del inglés: *United States of America*).

ER: Retículo endoplásmico (del inglés: *Endoplasmic Reticulum*).

ERGIC: Compartimento intermedio entre ER-Golgi (del inglés: *ER-Golgi Intermediate Compartment*).

EPI: Epirubicina (del inglés: *Epirubicin*).

FB1: Fumonisina B1, inhibidor de ceramida sintasa (del inglés: *Fumonisin B1, Ceramide synthase inhibitor*).

FBS: Suero fetal bovino (del inglés: *Fetal Bovine Serum*).

FLM: Modelo de lógica difusa (del inglés: *Fuzzy Logic Model*).

GBA: Glucocerebrosidasa (del inglés: *Glucocerebrosidase*).

GEEC: Compartimentos endosómicos tempranos enriquecidos con proteínas ancladas a glicosil fosfatidilinositol (del inglés: *Glycosyl Phosphatidylinositol-anchored protein Enriched early Endosomal Compartments*).

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés: *Green Fluorescent Protein*).

Glu-Cer: Glucosilceramida (del inglés: *Glucosyl-ceramide*).

GMM: Modelo de mezclas Gaussianas (del inglés: *Gaussian Mixture Model*).

GPI: Glicosil fosfatidilinositol (del inglés: *Glycosylphosphatidylinositol*).

GPL: Glicerofosfolípidos (del inglés: *Glycerophospholipids*).

GSL: Glicoesfingolípidos (del inglés: *Glycosphingolipids*).

GTPasa: Guanosina Trifosfatasa (del inglés: *Guanosine Triphosphatase*).

GW: Inhibidor de N-SMasa (N-esfingomielinasa; del inglés: *Neutral sphingomyelinase inhibitor*).

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés: *Human Epidermal growth factor Receptor 2*).

HRT: Terapia de reemplazo hormonal (del inglés: *Hormone Replacement Therapy*).

HCQ: Hidoxicloroquina (del inglés: *Hydroxychloroquine*).

IBC: Cáncer de mama inflamatorio (del inglés: *Inflammatory Breast Cancer*).

ICD: Muerte celular inmunogénica (del inglés: *Immunogenic Cell Death*).

IDC: Carcinoma Ductal Invasivo (del inglés: *Invasive Ductal Carcinoma*).

ILC: Cáncer Lobular Invasivo (del inglés: *Invasive Lobular Cancer*).

INEC: Instituto Nacional de Estadística y Censo de Costa Rica.

KDSR: 3-cetodihidroesfingosina reductasa (del inglés: *3-ketodihydrosphingosine reductase*).

LC3/m-Cherry: Sensor recombinante de autofagia (mCherry-EGFP-LC3B).

LCIS: Carcinoma Lobular *In Situ* (del inglés: *Lobular Carcinoma In Situ*).

Lys: Lisosoma (del inglés: *Lysosome*).

MBC: Cáncer de mama metastásico (del inglés: *Metastatic Breast Cancer*).

MCF-7: Línea celular de carcinoma de mama.

MS: Ministerio de Salud de Costa Rica.

Myr: Miriocina, Inhibidor de serina palmitoil-transferasa (del inglés: *Myriocin, serine palmitoyltransferase inhibitor*).

NADPH: Cofactor Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (del inglés: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*).

NBD: Fluoróforo nitrobenzofurazan (del inglés: *Nitrobenzofurazan*).

NCI: Inhibidor de la ceramidasa neutra/alcalina (del inglés: *Neutral/alkaline Ceramidase Inhibitor*).

NCI-60: Panel de líneas celulares de cáncer del Instituto Nacional de Cáncer, EE.UU (del inglés: *National Cancer Institute, EE.UU*).

NIH: Instituto Nacional de Cáncer del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (del inglés: *National Cancer Institute - National Institutes of Health*).

ODE: Modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias (del inglés: *Ordinary Differential Equations*).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

P: Fagóforo (del inglés: *Phagophore*).

PAC: Paclitaxel.

pacCer: Ceramida bifuncional (del inglés: *Photoactivatable and Clickable Ceramide*).

pacFA: Ácido graso bifuncional (del inglés: *Photoactivatable and Clickable Fatty Acid*).

pacGlu-Cer: Glucosilceramida bifuncional (del inglés: *Photoactivatable and Clickable Glucosyl-ceramide*).

pacSM: Esfingomielina bifuncional (del inglés: *Photoactivatable and Clickable Sphingomyelin*).

pacSo: Esfingosina bifuncional (del inglés: *Photoactivatable and Clickable Sphingosine*).

PDMP: Inhibidor de la glucosilceramida sintasa (del inglés: *Glucosyl-ceramide synthase inhibitor*).

PI: Yoduro de propidio (del inglés: *Propidium Iodide*).

PM: Membrana plasmática (del inglés: *Plasma Membrane*).

RAP: Rapamicina (del inglés: *Rapamycin*).

RPMI: Medio de cultivo RPMI-1640 (del inglés: *Roswell Park Memorial Institute medium*).

S1P: Esfingosina 1- fosfato (del inglés: *Sphingosine-1-phosphate*).

S1PP: Esfingosina 1- fosfato fosfatasa (del inglés: *Sphingosine-1-phosphate phosphatase*).

SKI: Inhibidor de esfingosina quinasa II (del inglés: *Sphingosine kinase II inhibitor*).

SL- Bif: Esfingolípido bifuncional (del inglés: *Bifunctional Sphingolipids*).

SL: Esfingolípido(s) (del inglés: *Sphingolipids*).

SM: Esfingomielina (del inglés: *Sphingomyelin*).

SMasa: Esfingomielinasa (del inglés: *Sphingomyelinase*).

SM-BOD: Análogo de esfingomielina marcado con BODIPY (del inglés: *Fluorescent Sphingomyelin analog labeled with BODIPY*).

So: Esfingosina (del inglés: *Sphingosine*).

SPA: Espautina-2 (del inglés: *Spautin-2*).

SPC: Esfingosil-fosforil colina (del inglés: *Sphingosine phosphorylcholine*).

SphK: Esfingosina quinasa (del inglés: *Sphingosine kinase*).

SPT: Serina palmitoil-transferasa (del inglés: *Serine palmitoyltransferase*).

TNBC: Cáncer Triple Negativo (del inglés: *Triple Negative Breast Cancer*).

TOR: Torin-2.

TryPLE: Tripsina (del inglés: *Trypsin*).

UV: Ultravioleta.

WT: Forma “común” o “normal” de la población celular (del inglés: *Wild-Type*).

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja influenciada por múltiples factores genéticos y ambientales; se caracteriza por la replicación descontrolada de células que tienen la capacidad de invadir diferentes tejidos a través de metástasis. Las células cancerosas son receptoras de señales que se transmiten al interior de la célula y al núcleo para modular genes asociados con el aumento en la agresividad del tumor, angiogénesis, supervivencia o proliferación celular (1).

Este grupo de enfermedades posee opciones terapéuticas que incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. En el caso de las drogas quimioterapéuticas, estas son limitadas principalmente por la resistencia y la heterogeneidad tumoral, que convierte al tumor en un sistema robusto. La inestabilidad genómica del cáncer propicia la heterogeneidad intratumoral, esto le confiere mayor robustez al tumor a través de la variabilidad en el patrón de resistencia a los medicamentos entre las células individuales, siendo la resistencia a la quimioterapia el principal obstáculo para un tratamiento eficaz de los pacientes con cáncer (2).

La heterogeneidad fenotípica de las células de cáncer en cultivo predice la capacidad de respuesta a la quimioterapia, dado que los patrones de heterogeneidad permiten separar las poblaciones más sensibles y resistentes (3). A pesar de que se ha observado una amplia diversidad fenotípica, se ha logrado caracterizar la respuesta heterogénea de células tumorales contra grupos de fármacos (4).

Aunque en la actualidad existen muchos fármacos prometedores para diferentes blancos terapéuticos contra el cáncer, la heterogeneidad tumoral continúa siendo una barrera importante para determinar cuál es la terapia más eficiente para cada paciente (5).

Lo anterior, explica que la célula se comporta como un sistema de red complejo e interconectado donde las señales de estrés celular son transmitidas y sensadas por diferentes vías. Por lo tanto, las alteraciones a vías enteras de señalización, en particular aquellas

altamente interconectadas con otras, representan sensores muy prometedores para reportar la respuesta diferencial a la quimioterapia.

En particular, las interconversiones de los esfingolípidos (SL), que incluye: ceramida (Cer), ceramida 1-fosfato (C1P), esfingomielina (SM), glucosilceramida (Glu-Cer), esfingosina (So) y esfingosina 1-fosfato (S1P), son determinantes en el destino celular, la progresión y la sensibilidad a los fármacos contra el cáncer, como ha sido previamente estudiado (6). Es por lo anterior que la modulación de la vía de los esfingolípidos puede ser usada para generar estrategias de tratamiento y para combatir esta enfermedad (7).

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer: generalidades y estadísticas

El cáncer es una de las enfermedades que presenta más altos índices de mortalidad alrededor del mundo, siendo una carga importante para todos los sistemas de salud (8–10). Esta enfermedad se asocia con el envejecimiento y el estilo de vida de la población (11).

El cáncer está asociado con la proliferación desregulada de células tumorales; en lugar de responder adecuadamente a las señales que controlan el comportamiento celular normal, las células cancerosas crecen y se dividen sin control (12). De hecho, las células cancerosas pueden invadir tejidos y órganos normales y eventualmente diseminarse por todo el cuerpo (12, 13). La inflamación sistémica no específica por metástasis es la principal causa de mortalidad por cáncer (9).

El cáncer presenta más de 200 variantes distintas que afectan a más de 60 órganos del cuerpo humano. En algunos casos, los individuos pueden tener tumores *in situ* que pueden permanecer siempre inactivos; sin embargo, el 90% de todas las muertes relacionadas con el cáncer son causadas por metástasis. Las intervenciones terapéuticas generalmente sólo son efectivas en una etapa temprana del desarrollo del cáncer. Por lo tanto, es fundamental detectar tumores premalignos o premetastásicos cuando están restringidos a un determinado órgano para brindar un tratamiento eficaz y mejorar la probabilidad de supervivencia. Por lo tanto, la detección temprana, sensible y eficaz del cáncer que prevalece en diferentes órganos a través de sus biomarcadores específicos es uno de los temas más considerados de la investigación científica moderna en el tema (8).

Durante la dinámica de esta enfermedad, el cáncer se vuelve cada vez más heterogéneo y, como resultado de esta heterogeneidad, el tumor podría incluir una colección diversa de células que albergan características moleculares distintas (4, 14). La heterogeneidad celular confiere robustez al tumor frente a la quimioterapia, y esta propiedad de la quimiorresistencia sigue siendo el principal obstáculo para el tratamiento eficaz de los pacientes con cáncer (2, 15).

Por su parte, la secuencia de ADN puede cambiar debido a errores de copia introducidos por las ADN polimerasas durante la replicación. La importancia del daño y la reparación del ADN se hizo evidente porque los carcinógenos son mutágenos y provocan un cambio en la secuencia del ADN (16). Por tanto, los carcinógenos se dirigen al material genético, contribuyendo a la evolución de las células cancerosas hacia fenotipos más malignos (17).

Cada año, la Sociedad Estadounidense del Cáncer estima el número de nuevos casos de cáncer y muertes en los Estados Unidos (EE.UU) y compila los datos más recientes sobre la aparición y los resultados del cáncer en la población, utilizando datos de incidencia recopilados por los registros centrales de cáncer (hasta 2020) y datos de mortalidad recopilados por el Centro Nacional de Estadísticas de Salud (hasta 2021). En 2024, se prevé que se producirán 2.001.140 nuevos casos de cáncer y 611.720 muertes por cáncer en EE.UU. La mortalidad por cáncer siguió disminuyendo hasta 2021, evitando más de 4 millones de muertes desde 1991 gracias a la reducción del tabaquismo, la detección más temprana de algunos cánceres y mejores opciones de tratamiento tanto en el entorno adyuvante como en el metastásico (18).

Estos avances se ven amenazados por la creciente incidencia de 6 de los 10 tipos principales de cáncer. Las tasas de incidencia aumentaron durante 2015-2019 entre un 0,6% y un 1% anual para los cánceres de mama, páncreas y cuello uterino y entre un 2% y un 3% anual para los cánceres orales asociados al virus del papiloma humano, cáncer de próstata, de hígado, de riñón y melanoma. Las tasas de incidencia también aumentaron entre un 1% y un 2% anual para el cáncer de cérvix (entre personas de 30 y 44 años) y colorrectal (<55 años) en adultos jóvenes. El cáncer colorrectal era la cuarta causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres menores de 50 años a finales de los años 1990, pero ahora ocupa el primer lugar entre los hombres y el segundo entre las mujeres (18).

Según los reportes más recientes publicados el 1 de febrero de 2024 (Figura 1) por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 10 tipos de cáncer representaron en conjunto alrededor de dos tercios de los nuevos casos y muertes en todo el mundo en 2022; los datos incluyen 185 países y 36

tipos de cáncer. Al 2022, de los 10 tipos de cáncer reportados como más frecuentes, los principales son cáncer de pulmón, mama y colorrectal (19, 20).

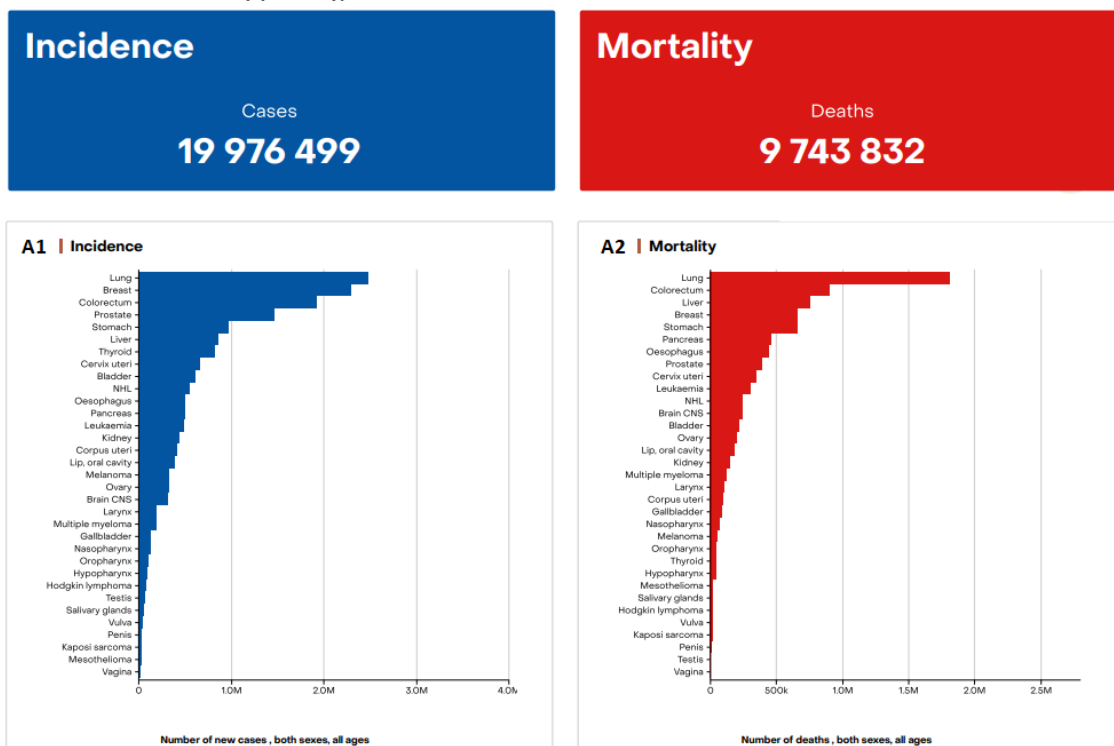
El cáncer de pulmón se reportó como el más frecuente en todo el mundo con 2,5 millones de nuevos casos, lo que representa el 12,4% del total de nuevos casos. En segundo lugar, se reportó el cáncer de mama femenino (2,3 millones de casos; 11,6%), seguido del cáncer colorrectal (1,9 millones de casos; 9,6%), el cáncer de próstata (1,5 millones de casos; 7,3%) y el cáncer de estómago (970 000 casos; 4,9%) (Figura 1-A1) (20).

Según los reportes de OMS, el cáncer de pulmón fue la principal causa de muerte por cáncer (1,8 millones de muertes, que representan el 18,7% del total de muertes por cáncer), seguido del cáncer colorrectal (900 000 muertes; 9,3%), el cáncer de hígado (760 000 muertes; 7,8%), el cáncer de mama (670 000 muertes; 6,9%) y el cáncer de estómago (660 000 muertes; 6,8%). La reaparición del cáncer de pulmón como el tipo más frecuente de esta enfermedad se puede deber, probablemente, a la persistencia del consumo de tabaco en el continente asiático (Figura 1-A2) (19, 20).

Los datos publicados por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer a febrero 2024, estiman que en 2022 hubo 20 millones de nuevos casos de cáncer y 9,7 millones de muertes (Figura 1-B1 y 1-B2). El número estimado de personas que estaban vivas a los 5 años siguientes a un diagnóstico de cáncer era de 53,5 millones (Figura 1-B3). Las estadísticas muestran que alrededor de 1 de cada 5 personas desarrollará cáncer a lo largo de su vida; aproximadamente 1 de cada 9 hombres y 1 de cada 12 mujeres mueren a causa de la enfermedad (19).

CANCER SITE RANKING

A) Incidence and Mortality (Globally)



B) Incidence, mortality and prevalence (Continentally)

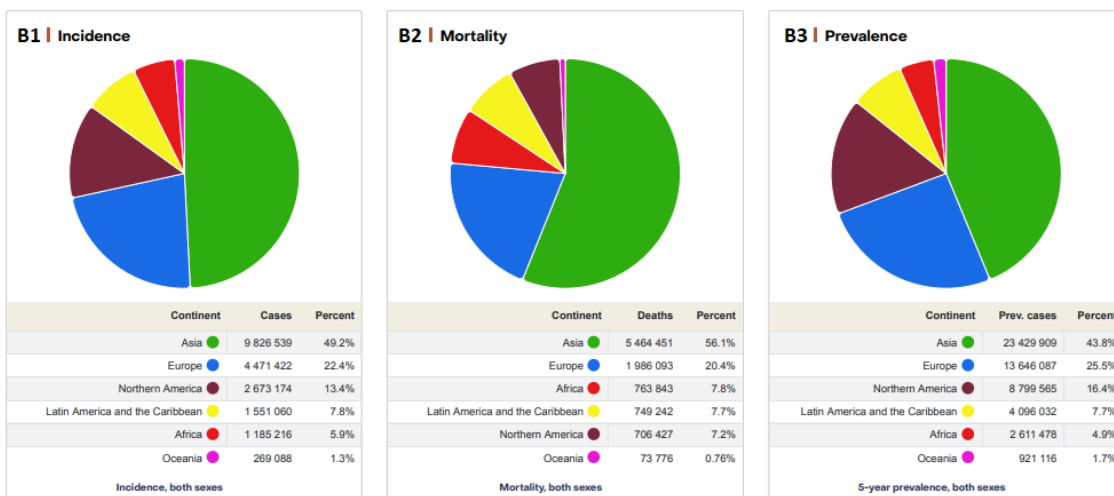


Figura 1. Clasificación de incidencia y mortalidad del cáncer. (A) Incidencia y Mortalidad a nivel global. (A1) Incidencia de los diferentes tipos de cáncer más importantes a nivel global, basado en el nuevo número de casos, todas las edades y ambos sexos. (A2) Mortalidad de los diferentes tipos de cáncer más importantes a nivel global, basado en el número de

muertes, todas las edades y ambos sexos. (B) Incidencia, mortalidad y prevalencia a del cáncer a nivel continental. (B1) Incidencia de cáncer segmentado por continente, basado en datos de ambos sexos. (B2) Índice de mortalidad del cáncer a nivel continental, basado en datos de ambos sexos. (B3) Índice de 5 años de prevalencia del cáncer por continente, basado en datos de ambos sexos. **Fuente:** adaptado de la página web *Globocan 2022* de *Global Cancer Observatory* de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (A, B) (20).

2.2 Cáncer de pulmón y mama: características

En el desarrollo de esta tesis, se usaron dos tipos de líneas celulares: células de cáncer de pulmón (A549) y células de cáncer de mama (MCF-7), por lo que, a continuación, se describirán las características más relevantes de los dos tipos de cáncer.

2.2.1 Cáncer de pulmón

Como se mencionó anteriormente, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo (19). Las estimaciones muestran que 234.580 personas serán diagnosticadas con enfermedad pulmonar en 2024 en EE.UU (21, 22).

Esto implica que, 1 de cada 16 personas será diagnosticada con cáncer de pulmón a lo largo de su vida, específicamente: 1 de cada 16 hombres y 1 de cada 17 mujeres (Figura 2-A); es decir, el cáncer de pulmón mata 3 veces más hombres que el cáncer de próstata en todo el mundo y 3 veces más mujeres que el cáncer de mama en EE.UU (23).

El principal factor de riesgo ante el cáncer de pulmón es el fumado, siendo responsable del 80% de las muertes por esta enfermedad pulmonar. El 20% restante de los diagnósticos por cáncer de pulmón son en personas que nunca han fumado, esto indica que anualmente 46.000 personas no fumadoras pueden tener este diagnóstico en EE.UU (24).

Otros factores de riesgo reportados son: asbestos, radiación, aire contaminado, metales (arsénico, cromo, cadmio), algunas sustancias químicas orgánicas y la exposición al gas radón. Adicionalmente, los antecedentes familiares y los factores genéticos también juegan un rol importante en el desarrollo de la enfermedad (23).

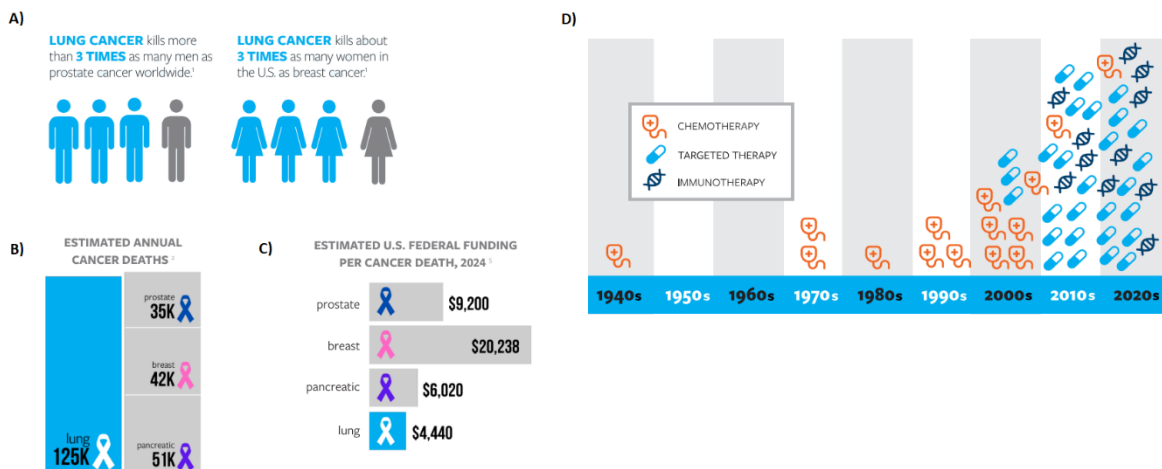


Figura 2. Principales características del cáncer de pulmón. (A) Mortalidad del cáncer de pulmón en hombres y en mujeres. (B) Inversión estimada de financiamiento en investigación por muerte debido a cáncer para el 2024. (C) Mortalidad anual estimada por cáncer. (D) Tratamientos contra el cáncer avalados a lo largo de las décadas. **Fuente:** adaptado de la página web *Lung Cancer Research Foundation* (A – D) (23).

Según los datos reportados por la Fundación de Investigación de Cáncer de Pulmón de EE.UU 654.620 personas han sido diagnosticadas con cáncer de pulmón en algún momento de sus vidas. Se estima que se pierden 125.070 vidas anualmente por esta enfermedad en EE.UU (Figura 2-B, (23)).

Anualmente, el cáncer de pulmón cobra tantas vidas como el cáncer de mama, páncreas y próstata combinados (Figura 2-B). No obstante, estos 3 tipos de cáncer reciben, en promedio, 3 veces más financiamiento para investigación que el cáncer de pulmón (Figura 2-C, (21)). La investigación conlleva mejores opciones de tratamiento y mayor sobrevida de pacientes.

Aunque los datos parecen alarmantes, los avances en el tratamiento y la detección temprana de la enfermedad han mostrado un constante descenso el número de nuevos diagnósticos de cáncer de pulmón y la tasa de mortalidad está disminuyendo aún más rápido

(Figura 2-D). Desde el 2006, la incidencia de casos diagnosticados ha disminuido un 2.5% anual en hombres y un 1% anual en mujeres (23).

2.2.1 Cáncer de mama

Según *The National Breast Cancer Foundation* (EE.UU, 2024), el cáncer de mama es una enfermedad en la que se forman células malignas en el tejido mamario. Hay distintos tipos de cáncer de mama que pueden afectar tanto a hombres como a mujeres, los que destacan (25):

1. Carcinoma Ductal *In Situ* (DCIS: *Ductal Carcinoma In Situ*): Es un tipo de cáncer de mama no invasivo, en el que se han detectado células anormales en el revestimiento del conducto de leche materno. Es un carcinoma muy temprano y altamente tratable, porque las células atípicas no se han diseminado fuera de los conductos. Es importante la detección y tratamiento para evitar su propagación al tejido mamario circundante (Figura 3-A).
2. Carcinoma Ductal Invasivo (IDC: *Invasive Ductal Carcinoma*): Es un tipo de cáncer mamario invasivo, donde las células anormales se han dispersado de los ductos hacia otras partes del tejido. Las células de cáncer invasivas pueden diseminarse hacia otras partes del cuerpo (Figura 3-B). El IDC es el tipo de cáncer de mama más común, siendo responsable del 70 – 80 % de todos los diagnósticos de cáncer de mama; además, es el tipo de cáncer de mama más común que afecta a hombres.
3. Carcinoma Lobular *In Situ* (LCIS: *Lobular Carcinoma In Situ*): Es una afección en la que se encuentran células anormales en los lóbulos del tejido mamario y no se han diseminado fuera de éstos. Es altamente tratable y no es común que ocurra cáncer invasivo; sin embargo, esta condición potencia el riesgo de desarrollar cáncer de seno. A diferencia del DCIS, el LCIS no se considera cáncer sino una condición de la mama.
4. Cáncer Lobular Invasivo (ILC: *Invasive Lobular Cancer*): Es un cáncer de mama invasivo que inicia en los lóbulos de la mama y se disemina al tejido normal circundante; asimismo, puede propagarse a través del sistema sanguíneo y linfático a otras partes del cuerpo. El ILC es el segundo tipo más común de cáncer de mama (más del 10% de los cánceres de mama son ILC) y, además es posible que no siempre

aparezca claramente en una mamografía y sea necesario un estudio por resonancia magnética.

5. **Cáncer Triple Negativo (TNBC: *Triple Negative Breast Cancer*):** Este tipo de cáncer implica que el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico hormonal (HER2), los receptores de estrógeno y los receptores de progesterona no están presentes en las células de cáncer de mama. Dado que las células tumorales carecen de los receptores necesarios, los tratamientos comunes como la terapia hormonal y los medicamentos dirigidos al estrógeno, la progesterona y el HER2 son ineficaces. El tratamiento más eficaz para este tipo de cáncer es la quimioterapia; de hecho, el cáncer de mama triple negativo puede responder incluso mejor a la quimioterapia en las primeras etapas que muchas otras formas de cáncer.
6. **Cáncer de mama inflamatorio (IBC: *Inflammatory Breast Cancer*):** Ocurre cuando las células cancerosas se infiltran en la piel y los vasos linfáticos de la mama. Representa del 1% al 5% de todos los casos de cáncer de mama, se considera poco común y agresivo. Además, es más difícil de diagnosticar que otros tipos de cáncer de mama y tiende a diseminarse más rápidamente (Figura 3-C).
7. **Cáncer de mama metastásico (MBC: *Metastatic Breast Cancer*):** Es la etapa 4 del cáncer de mama, indica que se ha propagado desde la ubicación original en la mama a otras partes del cuerpo. Se le llama metastásico cuando el cáncer de mama recurre, o regresa, a otra parte del cuerpo meses o años después del diagnóstico y tratamiento inicial del cáncer de mama; cuando el primer diagnóstico de cáncer de mama es metastásico, se denomina cáncer de mama metastásico *de novo* (Figura 3-D).
El IDC representa el 85% de los casos de cáncer de mama y suele propagarse hacia huesos, pulmones, hígado y cerebro. Por su parte, el ILC es responsable del 12% de los cánceres de mama y suele diseminarse a útero, ovarios, estómago, intestinos y, en algunos casos, a cerebro.

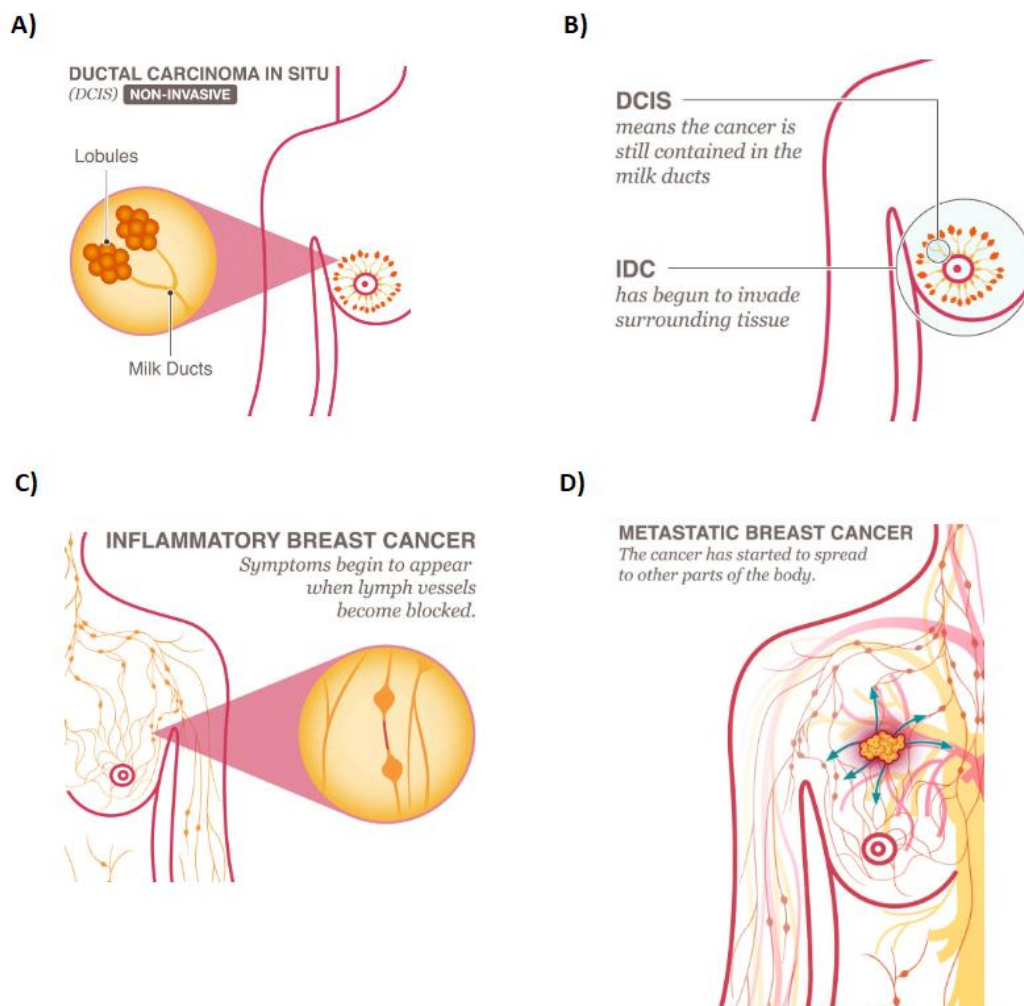


Figura 3. Tipos principales de cáncer de mama. (A) Carcinoma Ductal In Situ (DCIS: Ductal Carcinoma In Situ). (B) Carcinoma Ductal Invasivo (IDC: *Invasive Ductal Carcinoma*) y su diferencia con DCIS. (C) Cáncer de mama inflamatorio (IBC: *Inflammatory Breast Cancer*). (D) Cáncer de mama metastásico (MBC: *Metastatic Breast Cancer*). **Fuente:** adaptado de la página web *National Breast Cancer Foundation* (EE.UU, 2024) (A – D) (25).

Según los reportes de la OMS, las células del cáncer de mama comienzan dentro de los conductos lácteos y/o los lóbulos productores de leche de la mama. La forma más temprana (*in situ*) no pone en peligro la vida y puede detectarse en etapas tempranas. Las células cancerosas pueden diseminarse al tejido mamario cercano (invasión), a los ganglios

linfáticos cercanos u otros órganos (hacer metástasis), creando bultos o engrosamiento de las mamas y poniendo en riesgo la vida de la paciente (26).

Según el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NIH: *National Cancer Institute*), uno de los principales padecimientos en mujeres de EE.UU es el cáncer de mama, únicamente precedido por el cáncer de piel. Los reportes indican que los padecimientos de esta enfermedad incrementan a medida que las mujeres envejecen y, adicionalmente, el cáncer de mama suele ocurrir con más frecuencia en mujeres de tez blanca que en mujeres de tez morena; sin embargo, las mujeres de tez morena mueren de cáncer de mama con más periodicidad que las mujeres blancas (27).

El cáncer de mama rara vez ocurre en hombres. Debido a que los hombres con cáncer de mama generalmente tienen un bulto que se puede palpar, es probable que las pruebas de detección no sean útiles (27). Se estimó que, en 2023, hubo 2.800 nuevos casos de cáncer de mama invasivo en hombres. El riesgo de que un hombre sufra cáncer de mama a lo largo de su vida es de aproximadamente 1 entre 833; es decir, en EE.UU, menos del 1% de todos los cánceres de mama ocurren en hombres (28).

Anualmente, se ha reportado que el cáncer de mama representa el 12,5% de todos los nuevos casos anuales de cáncer en todo el mundo, siendo el tipo de cáncer más común del mundo. Solo en EE.UU, se ha reportado que el 30% de todos los casos nuevos diagnosticados de cáncer se asocia con cáncer de mama en mujeres estadounidenses, cada año; esto implica que 1 de cada 8 (13%) mujeres estadounidenses desarrollan cáncer de mama invasivo a lo largo de su vida (28).

En el año 2023, se estimó que 297.790 nuevos casos de cáncer de mama invasivo fueron diagnosticados en mujeres estadounidenses, aunado a los 55.720 nuevos casos de DCIS. No obstante, desde el año 2000 se ha reportado una disminución en las tasas de incidencia del cáncer de mama en EE.UU, asociado al uso de nuevas terapias como la terapia de reemplazo hormonal (HRT). El cáncer de mama sigue siendo una de las principales causas de muerte relacionada con el cáncer en las mujeres de EE.UU, sólo superada por el cáncer de pulmón (28).

Finalmente, la edad promedio de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama es 62 años; esto se refiere a que, el 50% de las mujeres con cáncer de mama son diagnosticadas con la enfermedad antes de los 62 años y el otro 50% se diagnostica después. Es menos común el diagnóstico de cáncer de mama en mujeres más jóvenes: aproximadamente 1 de cada 8 cánceres de mama invasivos se diagnostica en mujeres con menos de 45 años, mientras que aproximadamente dos de cada tres cánceres de mama invasivos se encuentran en mujeres de 55 años o más (18, 28).

2.3 Membranas celulares

2.3.1 Estructura y función de las membranas celulares

Las membranas celulares son cruciales para la vida celular. La estructura y la función de las células dependen críticamente de las membranas, que no solo separan el interior de la célula de su entorno, sino que también definen los compartimentos internos de las células eucariotas, incluidos el núcleo y los orgánulos citoplasmáticos (Figure 4) (29, 30).

La membrana plasmática (PM) encierra el contenido celular y mantiene las diferencias esenciales entre el citosol y el ambiente extracelular. En el interior de las células eucariotas, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, la mitocondria y otras organelas poseen membranas que mantienen las características diferenciales entre el contenido de cada organela y el citosol (31).

Por otra parte, los gradientes iónicos a través de membrana establecidos por la actividad de proteínas de membrana especializadas pueden ser usadas para la síntesis de ATP, para dirigir el movimiento transmembrana de solutos seleccionados o para producir y transmitir señales eléctricas (como ocurre en células nerviosas y musculares). En todas las células, la PM también contiene proteínas que actúan como sensores de señales externas, permitiendo a la célula cambiar su comportamiento en respuesta a cambios ambientales, incluyendo señales de otras células. Estas proteínas sensoras, transfieren la información a través de membrana (31).

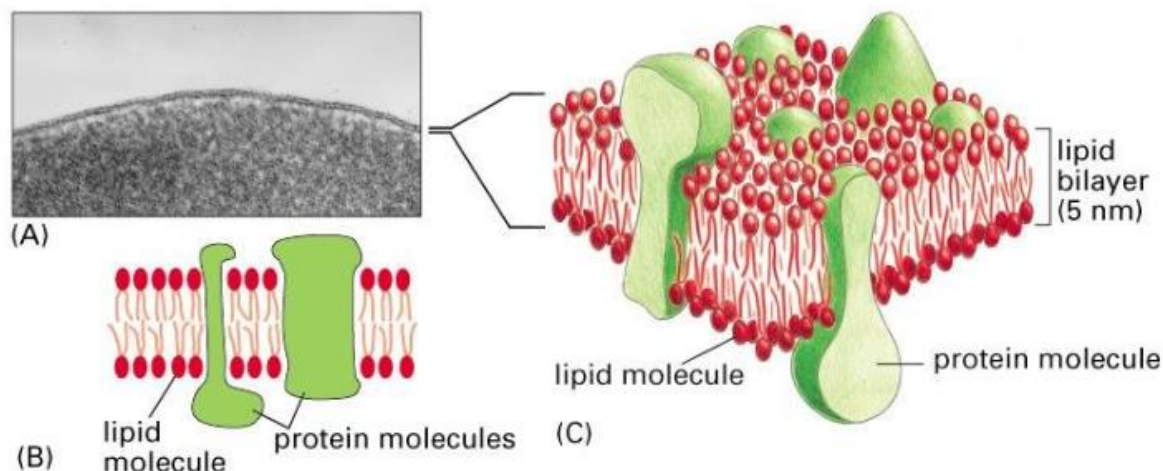


Figura 4. Conformación estructural de las membranas celulares. (A) Microscopía electrónica de la membrana celular de un eritrocito, donde se evidencia la separación del interior con el exterior. (B) Visión bidimensional y (C) Visión tridimensional de la estructura de la membrana celular y la disposición general de los lípidos y proteínas que lo constituyen. **Fuente:** tomado del libro Alberts *et al.* (2007) (31).

La formación de membranas biológicas se basa en las propiedades de los lípidos, y todas las membranas celulares comparten una organización estructural común: bicapas de fosfolípidos con proteínas asociadas, que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Las membranas celulares son dinámicas, su estructura es fluida y la mayoría de sus moléculas se mueven a nivel del plano de la membrana. La bicapa lipídica le da la estructura fluida a la membrana y funciona como una barrera relativamente impermeable ante el paso de moléculas solubles en agua.

Estas proteínas de membrana son responsables de muchas funciones especializadas: receptores que permiten que la célula responda a señales externas, transporte selectivo de moléculas a través de la membrana, transporte de electrones, la fosforilación oxidativa, entre otras. Asimismo, las proteínas de membrana controlan las interacciones entre las células de los organismos multicelulares (29) y desempeñan un papel vital en las membranas biológicas, ya que ayudan a mantener la integridad estructural, la organización y el flujo de material a través de las membranas (32).

Las proteínas transmembrana median las demás funciones de la membrana, transportando moléculas específicas a través de esta o catalizando reacciones asociadas a la membrana, como la síntesis de ATP (Adenosín Trifosfato). En la membrana plasmática, las proteínas transmembrana sirven de unión estructural con conexión al citoesqueleto a través de la bicapa lipídica hacia la matriz extracelular o a células adyacentes; otras funcionan como receptores para detectar y traducir señales químicas en el ambiente celular (31).

Los lípidos que constituyen las biomembranas, por su parte, contribuyen al menos al 50% de la masa total de la membrana, actúan como reservas de energía y juegan un papel relevante en la regulación de diversas funciones celulares al actuar como moléculas de señalización o como precursores de segundos mensajeros (1).

Los lípidos bioactivos presentes en las membranas biológicas incluyen a algunos SL, como Cer, C1P, SM, So, S1P y Glu-Cer, los cuales presentan un papel importante en la regulación del crecimiento celular, la muerte, la senescencia, la adhesión, la angiogénesis y el tráfico intracelular. Para descifrar los mecanismos de estas funciones celulares variadas, es necesario comprender la vía compleja del metabolismo de los SL y los mecanismos que regulan la producción y la función de los lípidos (33). Es por lo anterior que la regulación de la vía de los SL es de gran importancia entre los investigadores para visualizar estrategias de tratamiento contra el cáncer.

Además de los diversos tipos de lípidos que se producen en las membranas biológicas y las proteínas de membrana, los azúcares también son componentes importantes de su estructura. Los azúcares contribuyen a la estabilidad de la estructura biológica y se encuentran solo en un lado de la bicapa (en el espacio extracelular), unidos por enlaces covalentes a algunos lípidos y proteínas (32).

2.3.2 Organización celular

Como se mencionó anteriormente, la PM es un sistema complejo conformado por múltiples especies de lípidos y proteínas de membrana (31). Estos compuestos, forman una bicapa de aproximadamente 5 nm de ancho y, espacialmente, estos lípidos se distribuyen de forma asimétrica en la bicapa. Adicionalmente, la membrana contiene organizaciones

laterales enriquecidas en SL, colesterol y proteínas ancladas a glicosil-fosfatidilinositol (GPI), en las llamadas “balsas lipídicas”. (34).

Los lípidos más comunes a nivel de membrana son los glicerofosfolípidos (GPL); sin embargo, la composición de cada bicapa lipídica difiere según el tipo de célula y la distribución en los tejidos. Los GPL están compuestos por cadenas de ácidos grasos hidrofóbicos unidos a diacilglicerol, generalmente están insaturados y centrados en la membrana y, presentan diversos grupos con cabezas hidrofílicas que constituyen la superficie interna y externa de la membrana. Asimismo, los GPL también pueden actuar como anclajes de almacenamiento para moléculas de señalización y sus precursores modulan las funciones de las proteínas vecinas, como receptores y transportadores (30, 35).

Los esteroides, por su parte, son un subgrupo de esteroides compuestos de anillos fusionados con colas de hidrocarburos y grupos hidroxilo, que existen principalmente como colesterol en las células eucariotas. Estas moléculas se incorporan en bicapas lipídicas para proporcionar estabilidad a la membrana y pueden ser transformadas en moléculas con funciones biológicas, como las hormonas (35, 36).

Finalmente, los SL están compuestos por cadenas de hidrocarburos N-acilo generalmente largas y saturadas, una base esfingoide y un grupo principal. Pueden reconocer señales ambientales y degradarse o sintetizarse según las necesidades celulares, desempeñando así papeles cruciales en la transducción de señales y la modulación del metabolismo celular (35, 36). De esta manera, la diversidad composicional de los lípidos de membrana puede actuar como códigos complejos o señales condicionales de las células y estos diferentes patrones pueden modular funciones biológicas a través de las interacciones de lípidos y proteínas, como moléculas y receptores de señalización interna y externa (30).

2.3.3 Vía secretora

En las células eucariotas, las proteínas secretoras se translocan a través de la membrana del retículo endoplásmico (ER) hacia el lumen de forma cotraduccional a través del complejo de translocación (34). Las proteínas mal plegadas en el ER se transportan de regreso al citosol y el proteosoma las degrada en un proceso denominado “degradación

asociada al ER". Por su parte, las proteínas correctamente plegadas son transportadas a través del aparato de Golgi y liberadas al espacio extracelular mediante vesículas de la vía secretora. Las vesículas especializadas también median el transporte desde Golgi hasta el ER (31).

Como se muestra en la Figura 5, la vía secretora en términos de la vía de los SL inicia con la síntesis de Cer *de novo* en el ER, se transfiere directamente mediante transporte no vesicular al *trans*-Golgi mediante la proteína de transferencia de Cer (CERT), para producir principalmente SM. CERT presenta preferencias por especies de Cer con cadenas inferiores a 22 carbonos. Por otra parte, una porción pequeña de Cer sintetizada *de novo* se destina al *cis*-Golgi para la síntesis de glucosilceramida (Glu-Cer). Solo la Cer de cadena muy larga (24 carbonos) parece ser transportada vesicularmente al *cis*-Golgi a través del compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC). En cambio, las Cer más cortas es probable que se transporten por un mecanismo no vesicular desconocido al *cis*-Golgi para la síntesis de Glu-Cer. La Glu-Cer se glicosila aún más mediante dos rutas diferentes de glicosilación *intra*-Golgi, las cuales involucran vías dependientes de la proteína FAPP2 vesicular y la vía no vesicular. A través de este procesamiento diferencial, la Glu-Cer se transforma finalmente en una serie de complejos de glicosfingolípidos (GSL) (37, 38).

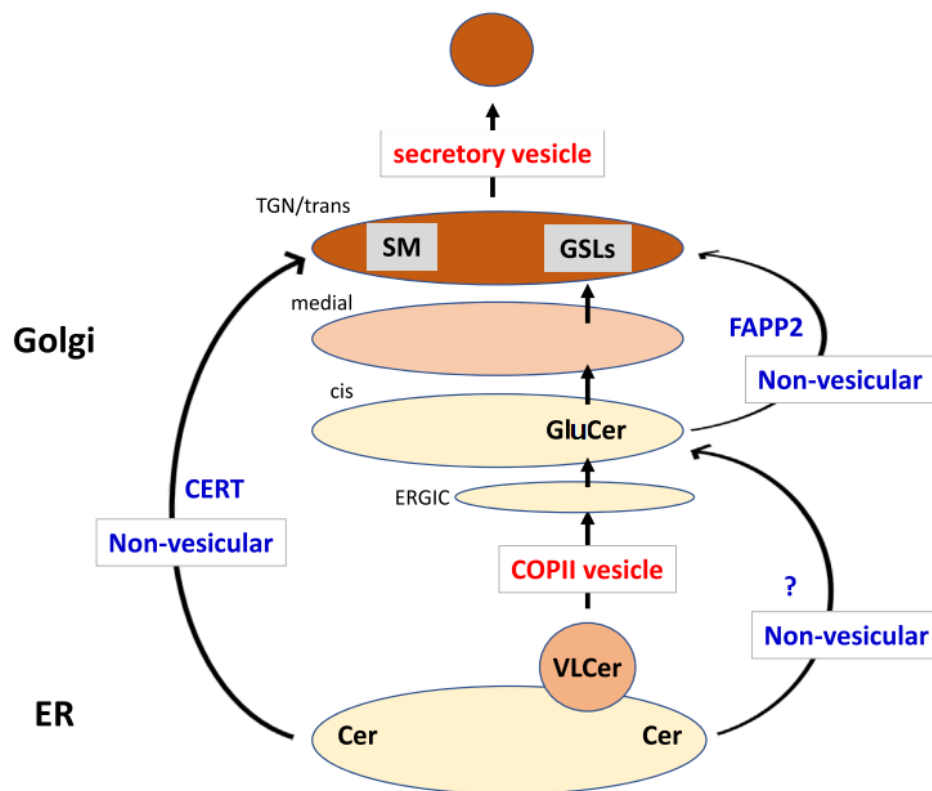


Figura 5. Vía secretoria para esfingolípidos (SL). En primer lugar, las moléculas secretoras son producidas por los ribosomas de la membrana del retículo endoplásmico (ER). Las vesículas que contienen las proteínas brotan de la membrana del ER y viajan al aparato de Golgi, que las dirige a su destino final: la membrana plasmática (PM). La vesícula y la PM se enganchan para fusionarse, liberando el contenido de la vesícula al exterior de la célula. **Fuente:** adaptado de Funato *et al.* (2019) (37, 38).

2.3.4 Vía endocítica

Las rutas endocíticas de transporte facilitan la internalización de carga exógena, creando una red compleja de tráfico intracelular (Figura 6). Se han identificado muchas vías de entrada a las células, que varían en las cargas que transportan y en la maquinaria proteica que facilita el proceso endocítico (39). La internalización inespecífica de grandes volúmenes de líquido (pinocitosis) ocurre en todas las células y, generalmente se desencadena por estímulos externos como los factores de crecimiento (34, 40, 41).

Las moléculas son captadas del exterior de la célula mediante vesículas endocíticas que se fusionan con los endosomas tempranos. Los receptores de membrana se reciclan hacia la membrana plasmática por medio de endosomas de reciclaje. Los endosomas tempranos maduran para dar lugar a endosomas tardíos. Las vesículas de transporte que llevan las hidrolasas ácidas desde la red *trans*-Golgi, se fusionan con los endosomas tardíos, los cuales se transforman en lisosomas tras adquirir un complemento completo de enzimas lisosómicas. Las hidrolasas ácidas se disocian del receptor de manosa-6- fosfato cuando las vesículas de transporte se fusionan con los endosomas tardíos y estos receptores regresan de nuevo a la red *trans*-Golgi (34, 38).

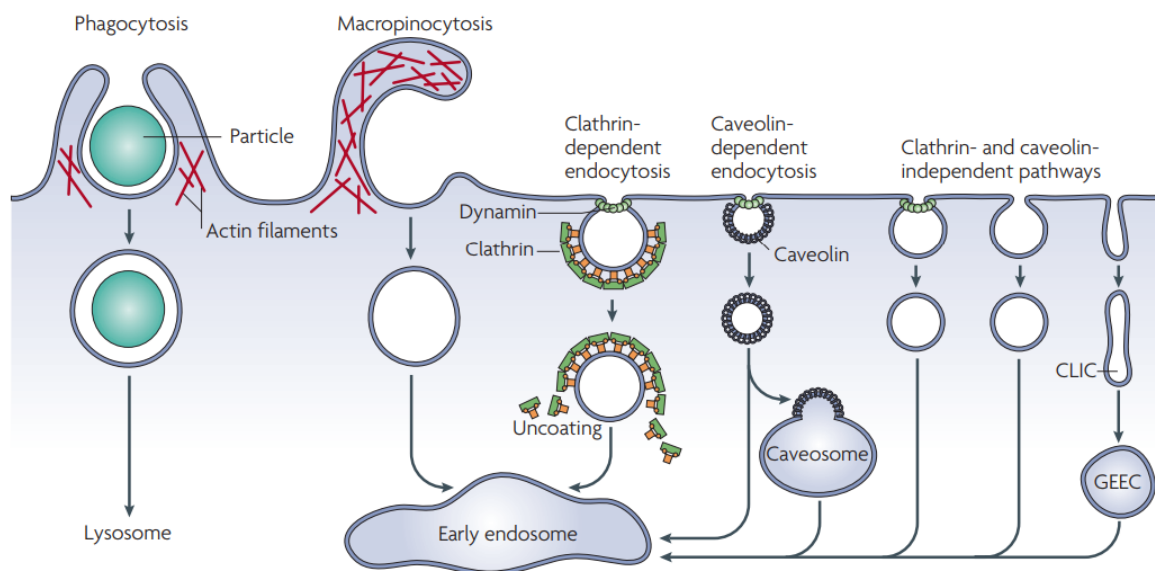


Figura 6. Vías de entrada a la célula. Las partículas grandes pueden captarse mediante fagocitosis, mientras que la captación de líquidos se produce mediante macropinocitosis. Ambos procesos parecen desencadenarse y depender de la remodelación de la membrana plasmática (PM) mediada por actina a gran escala. En comparación con las otras vías endocíticas, el tamaño de las vesículas formadas por fagocitosis y macropinocitosis es mucho mayor. Numerosas cargas pueden endocitarse mediante mecanismos que son independientes de clatrina (la proteína de cubierta) y de dinamina (la enzima Guanosina Trifosfatasa (GTPasa) de fisión). La mayoría de las cargas internalizadas se entregan al endosoma temprano a través de vesículas (vesículas recubiertas de clatrina o caveolina) o intermedios

tubulares (conocidos como transportadores independientes de clatrina y dinamina (CLIC)) que se derivan de la PM. Algunas vías pueden transitar primero hacia compartimentos intermedios, como el caveosoma o los compartimentos endosómicos tempranos enriquecidos con la proteína anclada de glicosil-fosfatidilinositol (GEEC), en la ruta hacia el endosoma temprano. **Fuente:** tomado de Mayor y Pagano (2007) (41).

2.4 La vía de los esfingolípidos

Los SL son moléculas bioactivas y componentes esenciales de todas las membranas eucariotas (42), suelen sintetizarse en el ER a partir de precursores no esfingolípidos (43). En general, los SL comprenden una amplia gama de lípidos complejos en los que el componente de mayor importancia es una base de cadena larga o esfingoide, que está unida a un ácido graso a través de un enlace amida, como se puede observar en la Figura 7 (43).

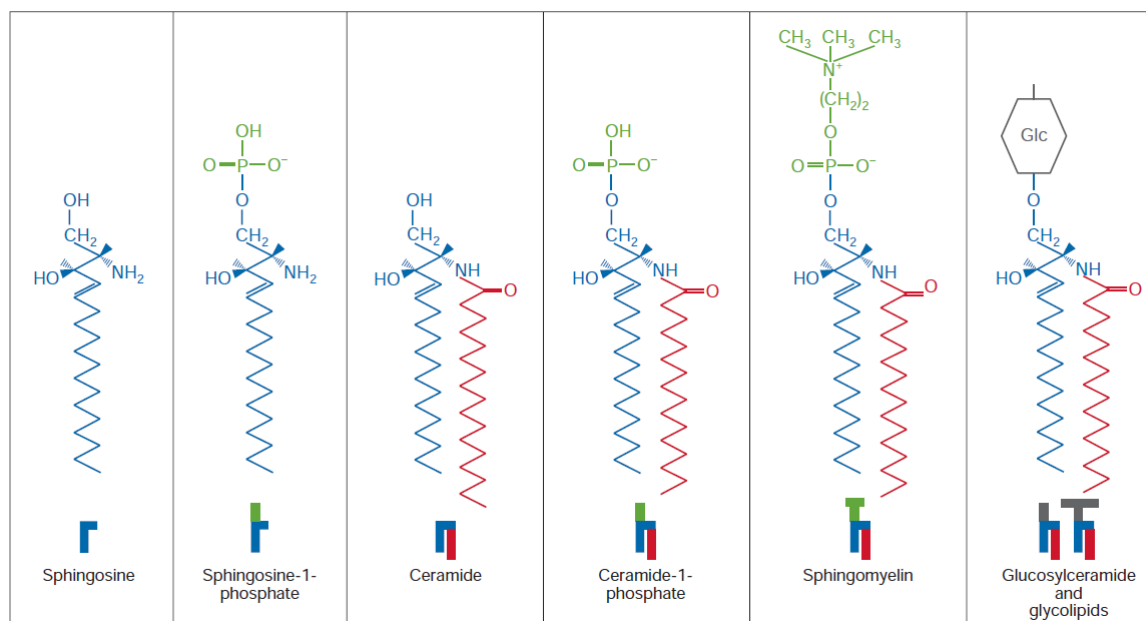


Figura 7. Estructura de los esfingolípidos (SL) más relevantes. Por simplicidad, solo se muestra un tipo de base esfingoide (esfingosina (So), en azul), un solo tipo de ácido graso

(ácido palmítico, en rojo) acilado en el grupo amino, un glicosfingolípido- GSL (glucosilceramida (Glu-Cer), en negro). **Fuente:** tomado de Futerman y Hannun (2004) (44).

La modificación de esta estructura básica en los SL es lo que da lugar a la vasta familia de SL que juegan un papel importante en la biología de la membrana y proporcionan muchos metabolitos bioactivos que regulan la función celular (43).

El área mejor definida de la biología de los SL es el metabolismo, ya que se han determinado la mayoría de las vías bioquímicas de síntesis y degradación mediante las enzimas involucradas (45). Las primeras biosíntesis de SL implicaron la formación de la base esfingoides seguida de la unión de un ácido graso para generar dihidroceramida; en eucariotas hay interconversión para generar Cer, que a su vez sirve como precursor de la SM y otros SL complejos que se forman mediante la adición de sustituyentes específicos en la posición C1, unido al grupo hidroxilo (Figura 7). La descomposición de los SL complejos se produce por degradación gradual, que da como resultado la formación de Cer, que en sí misma se degrada por la acción de una familia de ceramidasa para regenerar las bases esfingoides. Estas bases sirven como sustratos para las esfingosina quinasa que forman S1P (43, 44).

El metabolismo de los SL puede regularse en múltiples niveles, incluso a través del control de la expresión enzimática, las modificaciones postraduccionales y los mecanismos alostéricos. Algunos de estos niveles de regulación son específicos del tipo de célula, ya sea para controlar cuál es el SL que se sintetiza durante las diferentes etapas del metabolismo celular o en respuesta a señales específicas (44).

La síntesis de Cer en las células se produce en el ER; como la naturaleza hidrofóbica de la Cer impide su transferencia espontánea a través del citosol (46), debe viajar desde el ER hasta el aparato de Golgi mediante mecanismos facilitados; se demostró que esto ocurre tanto por transporte vesicular como no vesicular (Figura 5). Por su parte, la SM y los GSL complejos se sintetizan en el aparato de Golgi (Figura 8) (44). Adicionalmente, según Bionda *et al* (2004), la SM y otros SL se encuentran en el núcleo y en las mitocondrias (Figura 8; (47)), y no solo en las depresiones de la membrana del ER (44).

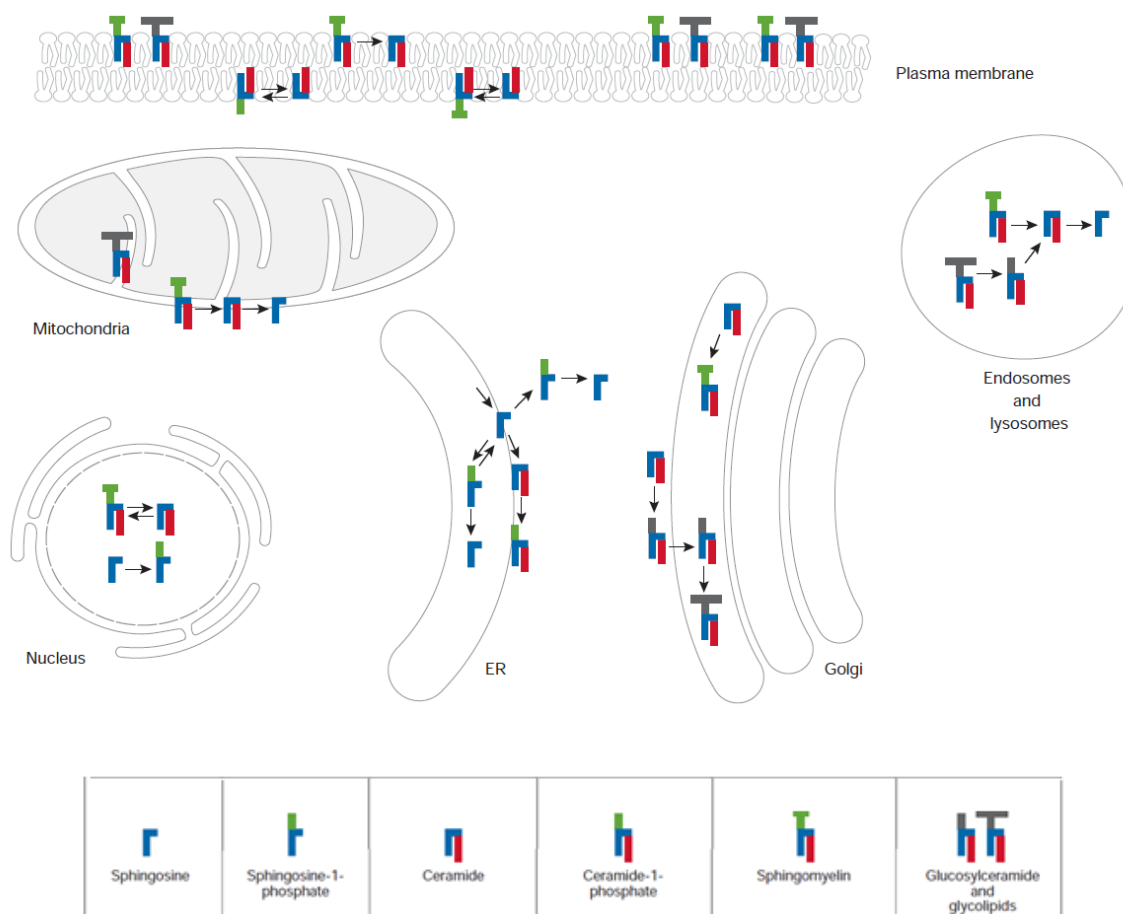


Figura 8. Rutas metabólicas y los sitios intracelulares donde ocurren algunas de reacciones de interconversión de esfingolípidos (SL). La topología es incierta particularmente para las reacciones que ocurren en el núcleo y las mitocondrias. Los bloques de construcción de lípidos están codificados por colores de acuerdo con las estructuras que se muestran en la Figura 7 **Fuente:** tomado de Futerman y Hannun (2004) (44).

Considerando la función de los SL como segundos mensajeros en los espacios intra y extracelulares, es esencial monitorear la síntesis o descomposición de los SL y las actividades enzimáticas relacionadas con los SL para comprender la transducción de señales y los estados de las células (48, 49) (Figura 9). La SM, la Cer y otros lípidos, se aglomeran para formar balsas lipídicas asimétricas pero equilibradas a través de la membrana celular (30).

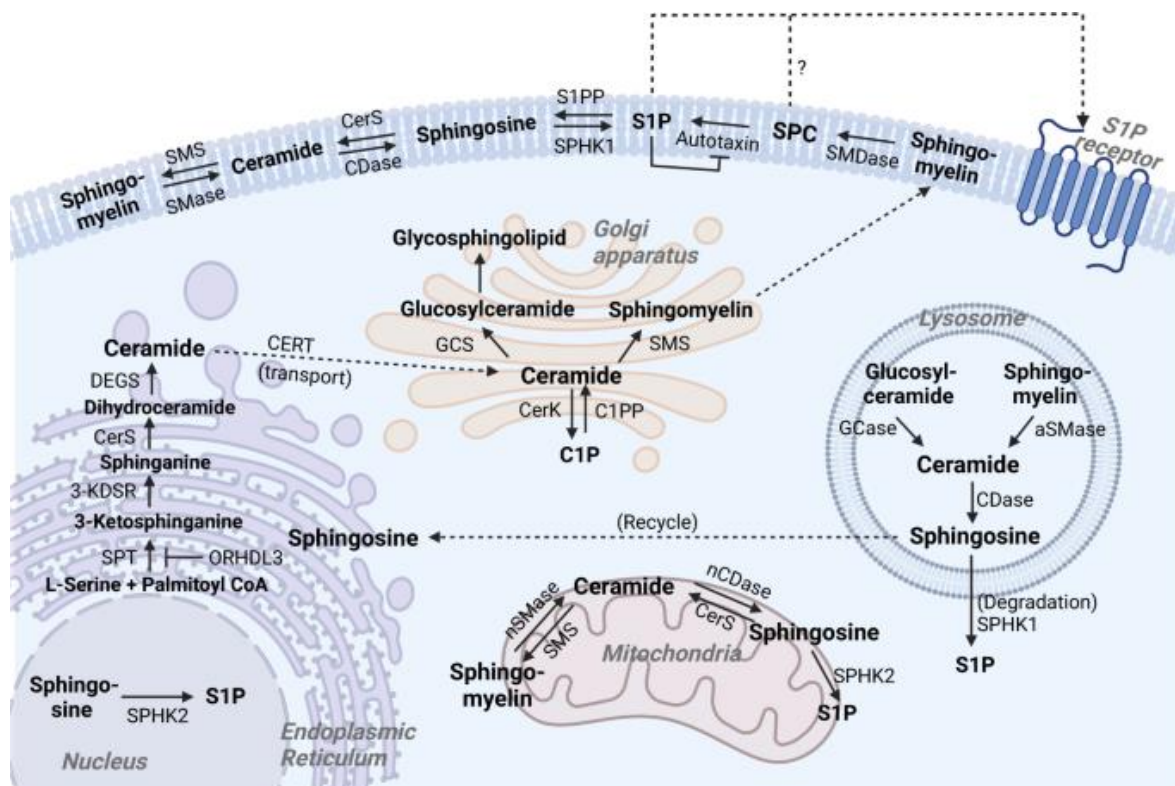


Figura 9. Metabolismo de los esfingolípidos (SL) a nivel celular. Los SL, como componentes de las membranas celulares y subcelulares, pueden sintetizarse mediante enzimas en serie (vía *de novo*) y también pueden degradarse de esfingomielina (SM) y ceramida (Cer) a SL más pequeños (vía residual (*salvage pathway*)) como moléculas de señalización. **Fuente:** tomado de Lee *et al.* (2023) (30).

La Cer es un SL importante, altamente concentrado en la PM y puede generarse mediante síntesis *de novo* a partir de palmitoil-Coenzima A (palmitoil-CoA) y L-serina por medio de reacciones secuenciales de serina palmitoiltransferasa (SPT), ceramida sintasa (CerS) y dihidroceramida desaturasa en el nivel citosólico del ER (Figura 9). Cuando este SL se transfieren al aparato *trans*-Golgi, los lisosomas y la PM desde el ER, la Cer puede interconvertirse en SM mediante la esfingomielina sintasa (codificada por el gen *SGMS*) y, de esta forma, la SM aumenta gradualmente su concentración para generar la mayoría de los SL de la PM, los cuales responden a señales ambientales como precursores de segundos mensajeros en los procesos de señalización (50). Por el contrario, la Cer puede restaurarse

mediante la hidrólisis de SM por diferentes esfingomielinasas (SMasas) en diferentes ubicaciones celulares (48–50). Aunque la Cer puede actuar como una molécula bioactiva de señalización en una variedad de respuestas fisiológicas, pueden degradarse en So y luego transformarse en S1P mediante la acción de la ceramidasa y esfingosina quinasas (SphK), respectivamente, o ser fosforiladas por ceramida quinasa (CerK) para generar C1P (51–53). En un circuito de retroalimentación negativa, C1P puede inhibir la actividad de SMasa y SPT, bloqueando la acumulación excesiva de Cer (54, 55).

Por el contrario, la Cer se puede recuperar de C1P mediante la fosfatasa C1P y S1P, mientras que la So se recupera mediante la fosfatasa S1P y CerS, en lo que se conoce como vía residual (*salvage pathway*), disminuyendo la producción excesiva de sus metabolitos (48, 53). De manera independiente de la SMasa, la SM se puede degradar a esfingosil-fosforil colina (SPC) y luego transformarse en S1P mediante las acciones de la esfingomielina desacilasa y la autotaxina (ATX), la última de las cuales es un ectonucleótido pirofosfatasa (fosfodiesterasa con actividad lisofosfolipasa D), originalmente identificado como un factor regulador de tumores para la supervivencia y la proliferación (Figura 9) (30, 56).

En la Figura 10, se muestra otro esquema de visualización de la vía metabólica de SL, en la cual se detallan las enzimas y las especies lipídicas en cada etapa, con sus respectivas estructuras.

Como se mencionó anteriormente, la biosíntesis de SL puede generarse mediante la síntesis *de novo* o la vía residual (*salvage pathway*). A continuación, una breve descripción de las rutas (como complemento a la Figura 9):

2.4.1 Síntesis *de novo*

Inicia en el ER con la condensación del aminoácido L-serina y un acil-graso (palmitoil-CoA), la cual produce 3-cetodihidroesfingosina mediante la SPT. La 3-cetodihidroesfingosina se reduce al aminoalcohol, esfinganina (dihidroesfingosina) mediante la 3-cetodihidroesfingosina reductasa (KDSR) dependiente del cofactor nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (57).

La esfinganina se puede transformar en tres derivados distintos: el primero es la esfinganina-1-fosfato, que se genera mediante la fosforilación dependiente de ATP por la SphK; el segundo derivado es la fitoesfingosina (4-hidroesfingosina), que permite la adición de un grupo hidroxilo en C4 mediante la dihydroesfingosina hidroxilasa (58); finalmente, el tercer derivado de la esfinganina es la formación de dihidroceramida, con la enzima dihidroceramida sintasa (conocida como CerS), la cual cataliza la unión de un grupo acil-graso CoA mediante un enlace amida al grupo amino libre de la esfinganina (59). La dihidroceramida producida, es deshidratada por la dihidroceramida desaturasa para generar Cer (57, 60–63).

2.4.2 Vía residual (*salvage pathway*)

Los SL complejos, como SM y otros GSL, se degradan parcialmente y sus respectivos componentes se reciclan para formar Cer en lo que se conoce como vía de rescate o residual (*salvage pathway*). La hidrólisis de SM produce Cer y fosforilcolina mediante enzimas SMasas y se conoce como “vía de la esfingomielinasa”. Los GSL complejos, se transportan desde la PM a lo largo de rutas endocíticas hasta los lisosomas, donde son degradados por enzimas específicas con la ayuda de proteínas accesorias (64).

Los GSL complejos también se pueden reciclar para reformar Cer mediante la hidrólisis gradual de unidades de carbohidratos, dejando finalmente un GSL simple como la Glu-Cer; luego, la glucocerebrosidasa (GBA) convierte la Glu-Cer en Cer.

Tras la eliminación de los restos de glicano, el producto restante es Cer, que luego es desacilada por ceramidasa, produciendo So y un ácido graso libre. La So se produce exclusivamente en la vía de rescate mediante la hidrólisis de SL complejos y Cer. La fosforilación de la So por las esfingosinas quinasas (SphK1 y SphK2) produce S1P. Alternativamente, la So puede transportarse al ER, donde es reutilizada para la formación de Cer mediado CerS y la posterior producción de SL complejos (57, 61).

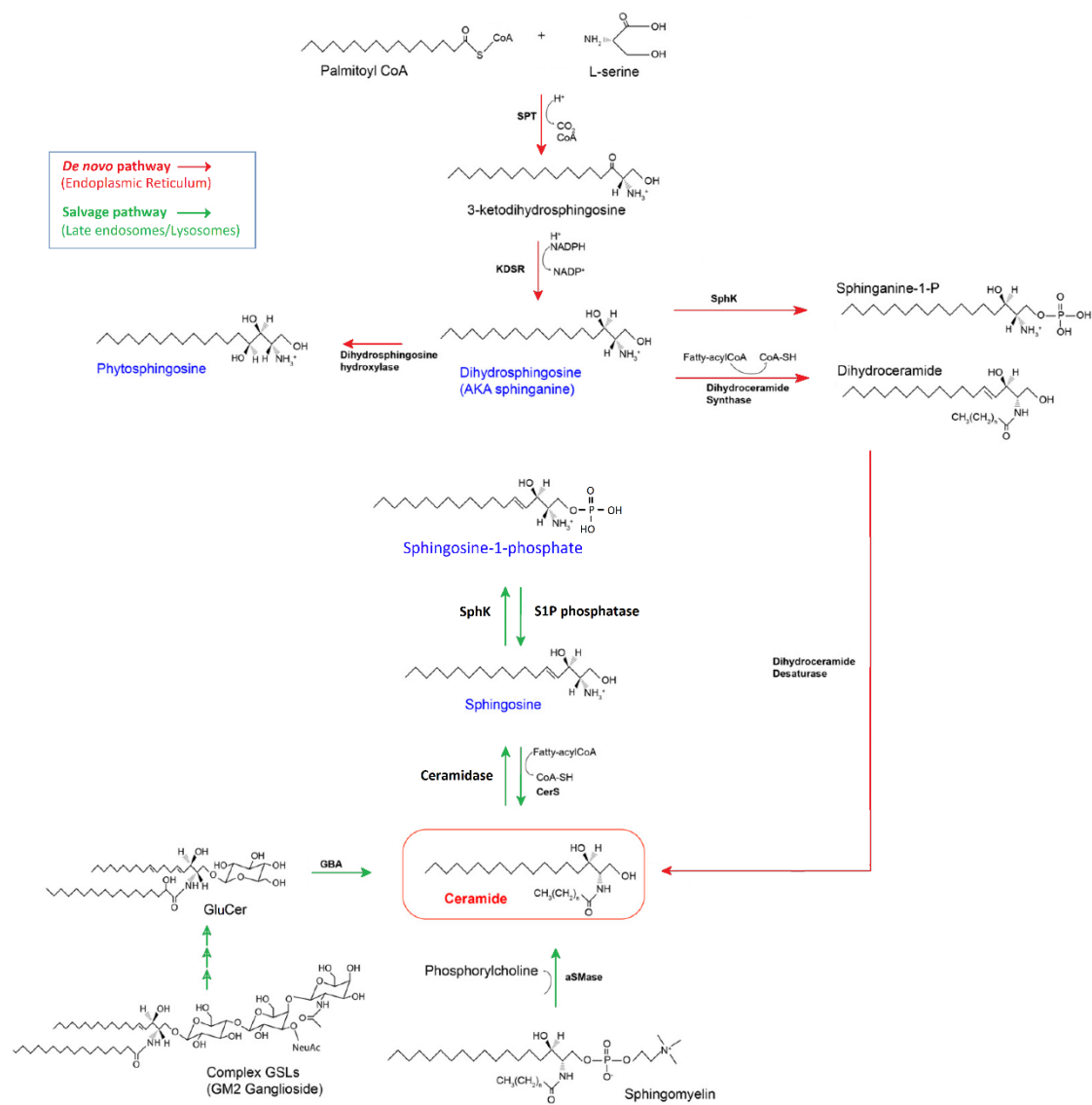


Figura 10. Vía metabólica de esfingolípidos (SL) mediados por la síntesis *de novo* y la vía residual (*salvage pathway*). Se muestra un esquema resumido de las vías de biosíntesis que pueden producir ceramida (Cer), incluida la vía *de novo* (flechas rojas) y la vía residual (flechas verdes). Todas las bases esfingoideas están representadas en azul. La vía *de novo* comienza con la síntesis de la base esfingalina y termina con la desaturación de Cer. La esfingalina también es capaz de producir fitoesfingosina o esfingalina-1-fosfato. La vía de recuperación consta de dos rutas: hidrólisis de esfingomiélinea (SM) y reciclaje de glicosfingolípidos (GSL). La SM se convierte en Cer mediante la hidrólisis de fosforilcolina. Los componentes de los GSL complejos también se pueden reciclar para

formar la Cer mediante la hidrólisis gradual de unidades de carbohidratos, dejando finalmente un GSL simple como glucosilceramida (Glu-Cer), donde la enzima glucocerebrosidasa (GBA) convierte la Glu-Cer en Cer. Abreviaturas en la figura: SPT: serina palmitoiltransferasa; GSL: glicosfingolípido; SM: esfingomielinina; aSMasa: esfingomielinasa ácida; Glu-Cer: glucosilceramida; GBA: glucocerebrosidasa; CoA: acil coenzima-A; CoA SH: coenzima A; SphK; esfingosina quinasa; CerS: ceramida sintasa. **Fuente:** adaptado de Quinville *et al.* (2021), Kitatani *et al.* (2007) y Kroll *et al.* 2020 (57, 61, 62).

Por otra parte, según los resultados expuestos por Molina *et al.* (2018), se modeló el destino metabólico de un análogo de SM con sonda BODIPY (SM-BOD) agregado a las células y se obtuvo una topología de red de la vía de los SL reducida al conjunto de reacciones que pueden considerarse dentro de las observables de la configuración experimental propuesta (Figura 11) (65).

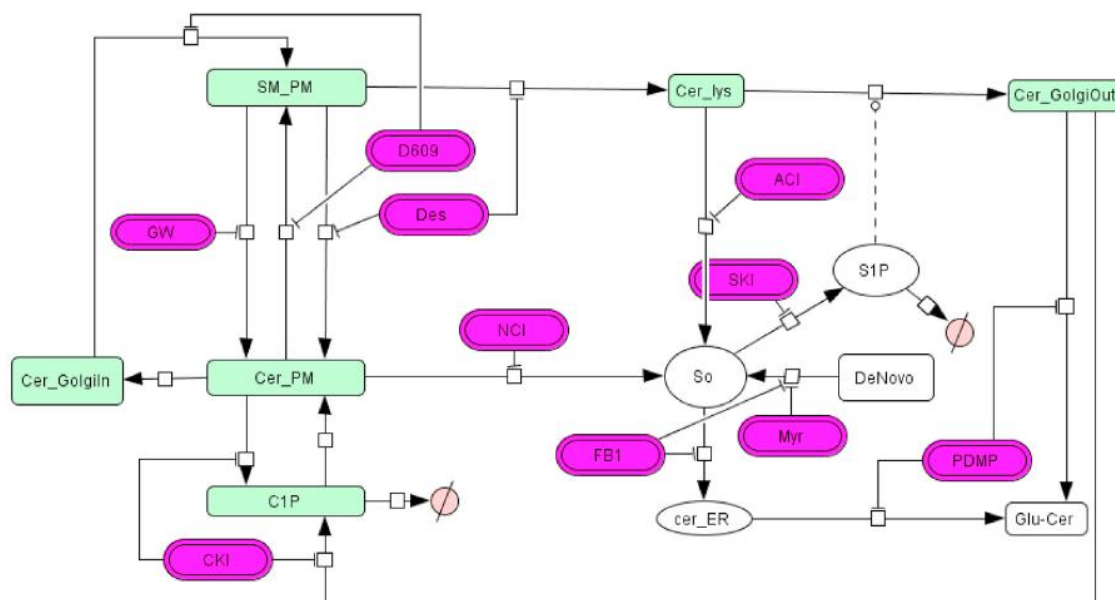


Figura 11. Modelo matemático del destino metabólico de un análogo de esfingomielinina (SM) marcado con sonda BODIPY (SM-BOD) ajustado a datos experimentales basados en

perturbaciones (65). Abreviaturas en la figura: SM: esfingomielina; PM: membrana plasmática; Cer: ceramida; Lys: lisosoma; C1P: ceramida 1-fosfato; GW: inhibidor de la esfingomielinasa neutra; D609: inhibidor de esfingomielina sintasa; Des: inhibidor de la esfingomielinasa ácida y ceramidasa ácida; CKI: inhibidor de ceramida quinasa; NCI: inhibidor de la ceramidasa neutra/alcalina; ACI: inhibidor de la ceramidasa ácida; SKI: inhibidor de esfingosina quinasa II; FB1: inhibidor de ceramida sintasa; Myr: Inhibidor de serina palmitoil-transferasa; PDMP: inhibidor de la glucosilceramida sintasa; SIP: esfingosina 1-fosfato; So: esfingosina; ER: retículo endoplásmico; Glu-Cer: glucosilceramida. Cajas verdes: presencia de fluorescencia. Cajas blancas: ausencia de fluorescencia. Cajas magenta: inhibidores de la vía de los esfingolípidos (SL). **Fuente:** tomado de Molina *et al.* (2018) (65).

La explicación del modelo de la vía de los SL expuesto por los autores se describe a continuación: en la Figura 11 se observan cajas verdes que indican que hay presencia de fluorescencia, cajas blancas que indican ausencia de la fluorescencia y cajas magenta que son los inhibidores estudiados de la vía de los SL. Iniciando con la interconversión de SM en la PM a Cer en el lisosoma, se observa que la fluorescencia permanece; si la Cer-lys se metaboliza a So, se hipotetiza que el ácido graso que contenía el grupo BODIPY fluorescente sería removido, lo cual implica la pérdida de fluorescencia (caja blanca) (65).

Por su parte, si la Cer es transportada al aparato de Golgi y es metabolizada a Glu-Cer, se hipotetiza que la adición de una molécula de glucosa a la Cer genera que la molécula de Glu-Cer sea altamente polar, de manera que termina atravesando la membrana, por lo cual se pierde la fluorescencia (Figura 11) (65).

Finalmente, la ruta en la que la SM-PM es metabolizada a Cer en el mismo compartimento celular y luego se metaboliza a So, se cree que la fluorescencia es removida debido a la pérdida del grupo ácido graso con el sensor BODIPY fluorescente, según el estudio publicado por Molina *et al.* (2018) (65).

Dentro del modelo matemático que describe la vía de los SL, se incluyeron los criterios: i) la reacción es perturbada por un inhibidor conocido de la vía SL, ii) la reacción involucra un sustrato o producto que conserva el grupo fluorescente BODIPY en su ácido graso (65).

2.5 Inhibidores de la vía de los esfingolípidos: Uso clínico

Los SL se modifican en múltiples tipos de cáncer y son responsables de la proliferación, progresión y metástasis tumoral. La mayor parte de las estrategias terapéuticas contra el cáncer han sido las combinaciones de fármacos convencionales basadas en quimioterapia, permitiendo un mayor auge de las terapias dirigidas y personalizadas para mejorar sinérgicamente las respuestas clínicas (66).

A continuación, se describen los usos clínicos que se han reportado para cada uno de los inhibidores estudiados en este proyecto:

GW: inhibidor de la esfingomielinasa neutra

Este inhibidor se está estudiando como una herramienta terapéutica potencial contra el cáncer debido a su papel en la vía de los SL, regulando importantes procesos celulares como la proliferación, diferenciación, apoptosis y la respuesta al estrés celular (67).

El uso clínico de GW aún está en fases experimentales y se requiere más investigación para definir las condiciones óptimas para su uso, así como para identificar tumores específicos que respondan mejor a esta estrategia. Además, debido a que los SL tienen roles clave en múltiples funciones celulares normales, es crucial garantizar que el uso de GW no cause efectos adversos significativos en células sanas (68).

D609: inhibidor de esfingomielina sintasa

La esfingomielina sintasa es la enzima responsable de la conversión de Cer en SM y su inhibición puede tener efectos profundos en la homeostasis de los SL, alterando la proliferación celular, la apoptosis y otros procesos importantes en la progresión tumoral (69).

Aunque D609 es una herramienta prometedora en el contexto del cáncer, su uso clínico aún presenta algunos desafíos importantes. Uno de los principales obstáculos es garantizar que el aumento de Cer ocurra de manera selectiva en las células cancerosas sin afectar significativamente a las células sanas, ya que la Cer también desempeña funciones importantes en la homeostasis celular normal (70). Además, la complejidad de la vía de los SL y el *crossstalk* con otras rutas metabólicas clave requiere un conocimiento más detallado de los efectos específicos en distintos tipos de tumores.

Se han reportado estudios preclínicos y algunos ensayos clínicos tempranos para evaluar la eficacia y seguridad de los inhibidores de la esfingomielina sintasa en varios tipos de cáncer. No obstante, aún es necesario realizar más investigaciones para optimizar su uso y minimizar los efectos adversos en tejidos sanos (71).

Des: inhibidor de la esfingomielinasa ácida y ceramidasa ácida

Las enzimas de la esfingomielinasa ácida y la ceramidasa ácida juegan roles clave en la regulación de los niveles de Cer; la manipulación de estas enzimas puede tener efectos importantes en la supervivencia de las células tumorales y su respuesta a terapias anticancerígenas (72–74).

El uso de Des a nivel clínico busca modular los niveles de Cer y S1P para influir en el comportamiento de las células cancerosas. Los inhibidores de estas enzimas pueden aumentar la acumulación de Cer y reducir la producción de S1P, favoreciendo la apoptosis y reduciendo la proliferación celular (74).

Estudios han reportado que el uso de Des es particularmente útil en combinación con otras terapias anticancerosas, como la quimioterapia, la radioterapia y los inhibidores de otras vías metabólicas. Al manipular los niveles de Cer y S1P, estos inhibidores pueden aumentar la susceptibilidad de las células tumorales a la muerte celular inducida por estas terapias (75).

Un desafío clave es lograr que Des actúe de manera selectiva en las células tumorales sin afectar a las células sanas, ya que Cer y otros SL también están involucrados en procesos celulares normales y su alteración excesiva puede causar efectos adversos.

Actualmente, se están llevando a cabo estudios preclínicos y clínicos para evaluar la eficacia de Des en varios tipos de cáncer, incluyendo leucemias, linfomas y tumores sólidos como el cáncer de mama y de pulmón (73). Estos estudios exploran cómo la manipulación de la vía de los SL puede mejorar los resultados del tratamiento, especialmente en combinación con otras terapias dirigidas.

CKI: inhibidor de ceramida quinasa

La CerK convierte la Cer en C1P, un lípido bioactivo implicado en varios procesos celulares importantes, incluyendo la proliferación, la supervivencia, la inflamación y la migración celular, por lo tanto, manipular esta enzima puede afectar directamente el comportamiento de las células cancerosas (76).

CKI reduce la producción de C1P y, por lo tanto, busca interrumpir las señales de proliferación y supervivencia que benefician a las células cancerosas(77).

El uso de CKI se encuentra en las primeras etapas de investigación. Los estudios preclínicos en modelos animales y celulares han mostrado resultados prometedores en la reducción de la proliferación tumoral, la sensibilización a la quimioterapia y la disminución de la metástasis en varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer de mama, pulmón y páncreas (78, 79). Sin embargo, es crucial evaluar su eficacia y seguridad en humanos.

NCI: inhibidor de la ceramidasa neutra/alcalina

La ceramidasa neutra y la ceramidasa alcalina juegan un papel importante en la regulación de los niveles de Cer y otros SL bioactivos que participan en la proliferación celular, la apoptosis y la migración celular, por lo que el uso clínico de NCI es un área de investigación en crecimiento (80).

La implementación de NCI en clínica puede ser una estrategia terapéutica eficaz para aumentar los niveles de Cer en las células tumorales, desencadenando apoptosis y ralentizando la progresión del cáncer (81).

Un desafío clave en el desarrollo de NCI es lograr que estos compuestos actúen específicamente en las células cancerosas sin afectar negativamente a las células sanas, que

también dependen del equilibrio entre Cer y S1P para su funcionamiento normal. La selectividad es crucial para minimizar los efectos adversos y maximizar la eficacia del tratamiento (82).

El uso de NCI aún están en etapas preclínicas, pero los estudios en modelos animales han mostrado resultados prometedores, reduciendo la proliferación tumoral y mejorando la respuesta a la quimioterapia. Estos estudios están evaluando la eficacia de NCI en varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer de colon, pulmón, mama y próstata (83).

ACI: inhibidor de la ceramidasa ácida

La ceramidasa ácida es una enzima clave en el metabolismo de los SL, responsable de la degradación de Cer en So, que puede ser fosforilada para producir S1P. Este equilibrio entre Cer y S1P es crítico, ya que la Cer tiene propiedades pro-apoptóticas, mientras que el S1P favorece la supervivencia y proliferación celular. Por lo tanto, el uso de ACI puede aumentar los niveles de Cer y promover la muerte celular en tumores (84).

Aunque el desarrollo de ACI aún se encuentran en las fases preclínicas de investigación, algunos compuestos prometedores han sido identificados:

- LCL521: Este ACI ha mostrado efectos prometedores en estudios preclínicos al aumentar la acumulación de Cer y promover la apoptosis en células tumorales. También ha mostrado sinergia con drogas quimioterapéuticas en estudios de cáncer de mama (85).
- Carmofur: Aunque originalmente fue desarrollado como un agente quimioterapéutico, se ha descubierto que también es un inhibidor de la ceramidasa ácida. Se ha reportado que carmofur puede aumentar los niveles de Cer y potenciar la muerte celular en ciertos tipos de tumores (86).

Se requieren más investigaciones para asegurar su seguridad y efectividad, así como para identificar las mejores combinaciones terapéuticas y los tipos de cáncer en los que estos inhibidores serían más útiles (87).

SKI: inhibidor de esfingosina quinasa II

Existen dos isoformas principales de la SphK: SphK1 y SphK2, las cuales fosforilan la So para producir S1P. La manipulación de esta enzima a través de inhibidores puede reducir el crecimiento tumoral, inducir apoptosis y limitar la capacidad de las células cancerosas para sobrevivir y diseminarse (52).

Los SKI tienen el potencial de combinarse con otras terapias que también actúan sobre la vía de los SL, como los inhibidores de la ceramidasa o los moduladores de la Cer, aumentando la eficacia del tratamiento (52).

Varios inhibidores de esfingosina quinasa están en fases de investigación preclínica y clínica. Algunos ejemplos incluyen:

- SKI-II y FTY720 (Fingolimod): Son inhibidores de SphK que han mostrado eficacia en modelos preclínicos de cáncer, al reducir los niveles de S1P y aumentar la apoptosis en células tumorales (88, 89).
- ABC294640 (Opaganib): Es un inhibidor de SphK2 que ha avanzado a ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres como el carcinoma hepatocelular y el cáncer de próstata. Este compuesto también está siendo evaluado en combinación con otros agentes quimioterapéuticos (90).

Algunos inhibidores de esfingosina quinasa, como el Opaganib, están siendo evaluados en ensayos clínicos para diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de próstata y cáncer de páncreas. Los resultados preliminares sugieren que estos inhibidores son bien tolerados y pueden mejorar la respuesta a la quimioterapia. Aunque se necesita más investigación para optimizar su eficacia y minimizar los efectos adversos, estos inhibidores tienen el potencial de mejorar el tratamiento del cáncer, particularmente en combinación con terapias convencionales como la quimioterapia y la radioterapia (88, 91).

FB1: inhibidor de ceramida sintasa

El inhibidor de la CerS es una enzima clave en la vía de los SL, es una estrategia que ha despertado interés en la investigación oncológica. La CerS cataliza la síntesis de Cer

involucrada en la regulación de la apoptosis, la diferenciación celular, la senescencia y la respuesta al estrés celular (92).

Algunos estudios preclínicos han mostrado que el uso de FB1 puede mejorar los resultados de las terapias contra el cáncer. En modelos animales, los inhibidores de CerS han demostrado reducir el crecimiento tumoral y limitar la migración celular. Sin embargo, estos estudios están en etapas tempranas y aún no han sido trasladados a ensayos clínicos (93).

Myr: Inhibidor de serina palmitoil-transferasa

La SPT es la enzima que cataliza el primer paso y el más determinante en la biosíntesis de los SL, específicamente la SPT es responsable de la condensación de serina y palmitoil-CoA para formar 3-cetoesfinganina, que es un precursor de los SL (94).

Hasta el momento, Myr está principalmente en fases preclínicas. Los estudios en modelos animales y en líneas celulares han mostrado algunos resultados prometedores, pero todavía no se han realizado ensayos clínicos significativos (95). Las investigaciones se centran en dos enfoques principales:

- El desarrollo de moléculas que puedan bloquear la actividad de SPT de manera selectiva.
- La exploración de cómo Myr puede usarse junto con quimioterapias o radioterapias existentes para mejorar su eficacia.

PDMP: inhibidor de la glucosilceramida sintasa

El uso clínico de PDMP en la vía de los SL para combatir el cáncer es una estrategia terapéutica enfocada en interrumpir la síntesis de SL complejos. La glucosilceramida sintasa es una enzima clave, ya que busca convertir Cer en Glu-Cer. Este paso es fundamental para la formación de gangliósidos y otros GSL, que juegan roles importantes en la biología celular, como la señalización, proliferación y diferenciación (96).

El uso de PDMP permite bloquear la conversión de Cer a Glu-Cer, aumentando la acumulación de Cer y promoviendo la apoptosis en las células tumorales (97). Existen varios inhibidores de este tipo en investigación preclínica y clínica:

- Eliglustat: Este inhibidor de glucosilceramida sintasa, aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher (una enfermedad de almacenamiento de SL), está siendo evaluado por su capacidad para potenciar la quimioterapia en ciertos tipos de cáncer (96, 98).
- Venglustat: Otro inhibidor de glucosilceramida sintasa en desarrollo, orientado a enfermedades lisosomales, que está siendo investigado en estudios preclínicos para determinar su capacidad de revertir la resistencia a la quimioterapia en cánceres (99).

Algunos resultados preliminares han sido prometedores, mediante dosis combinatorias con quimioterapias; sin embargo, se necesitan más estudios para comprender completamente su eficacia y seguridad en el tratamiento del cáncer (100).

2.6 Resistencia a la quimioterapia y esfingolípidos

Los SL son moléculas clave para la homeostasis celular, que funcionan como componentes estructurales de las membranas biológicas y participan en la transducción de señales y la fisiología celular (101). El metabolismo de los SL se produce en varios compartimentos celulares que implican reacciones catalizadas principalmente por enzimas integrales periféricas o de membrana (Figura 9) (102). Además, la vía de los SL se considera como un sensor de estrés de amplio rango capaz de transducir señales de estrés de diferentes tipos (quimioterapia, radiación, infecciones, ligandos de la muerte, citocinas) (103) a muchas otras vías, incluidas la apoptosis intrínseca y extrínseca, la autofagia, ciclo celular y metabolismo del calcio (104).

Con lo anterior, estudios recientes han demostrado que los SL tienen múltiples funciones celulares, más allá del papel estrictamente estructural en la función celular. Se destaca el papel de los SL en los procesos de señalización celular, en funciones como moléculas bioactivas asociadas tanto a la muerte celular como a la supervivencia de las células, también en otras respuestas celulares implicadas con la inflamación y la protección contra patógenos asociados a procesos oncogénicos (62).

Según Kroll *et al.* (2020), muchos tumores muestran una desregulación del metabolismo de los SL y, se ha demostrado que el perfil de desregulación de SL es útil para determinar la presencia de un tumor y a su vez, la susceptibilidad a diversos tratamientos quimioterapéuticos y la determinación de las características metastásicas de las neoplasias malignas. Es por lo anterior que, se ha hecho evidente la importancia de comprender el metabolismo y el perfil de los SL en la clínica para diagnósticos y tratamientos anticáncer (62).

La homeostasis entre estos SL, independientemente de su sitio de origen, es relevante porque las composiciones de SL transformados y selectivamente sesgados pueden decidir el destino de las células, como el mantenimiento (muerte, supervivencia y proliferación), la renovación, senescencia, diferenciación, migración o retención, respuestas inmunitarias y metabolismo celular, y estas células colectivamente forman tejidos, órganos y sistemas de órganos y, en última instancia, determinan la vida del organismo (105–107).

La comprensión de la dinámica de los SL puede contribuir a mejorar la respuesta a los fármacos quimioterapéuticos mediante la manipulación del destino celular (2, 4). Según diversos estudios, los SL como la So y la Cer tienden a favorecer la señalización de mecanismos de muerte celular, lo cual ha sido sugerido como potenciales propiedades antitumorales (inducción de muerte celular programada y anti-proliferación) (103, 108); mientras que S1P, C1P y Glu-Cer promueven mecanismos de supervivencia, favoreciendo las actividades protumorales (supervivencia, proliferación, invasión, resistencia a multidrogas) (1, 33, 109). En la Figura 12 se muestran las estructuras de las moléculas lipídicas que juegan roles fundamentales en la definición del destino celular.

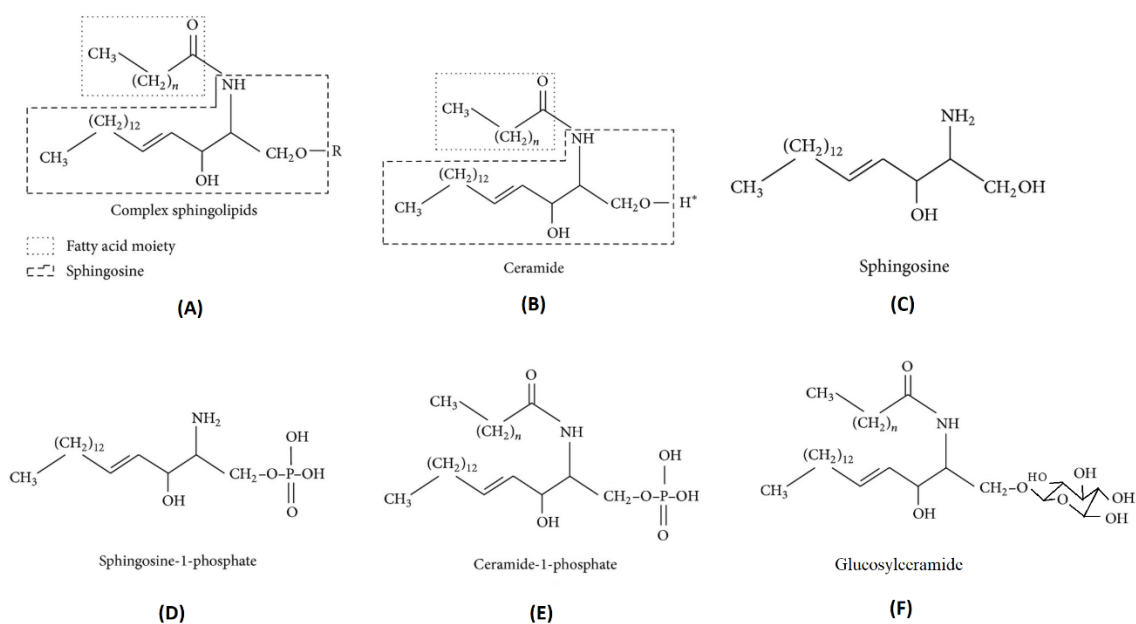


Figura 12. Estructura química de los principales esfingolípidos (SL) con funciones bioactivas de muerte y sobrevida celular. (A) Estructura general de los SL, compuestos principalmente por una base esfingoide y un ácido graso. (B) Estructura de la ceramida (Cer): un ácido graso de cadena larga unido a la esfingosina (So) mediante un enlace amida. (C) Estructura de la So. En los mamíferos, la So (principalmente C-18) es la principal base esfingoide. (D) Estructura de la esfingosina-1-fosfato (S1P). (E) Estructura de la ceramida-1-fosfato (C1P). (F) Estructura de la glucosilceramida (Glu-Cer). Los derivados fosforilados (C y E), se obtienen por acción de las respectivas quinasas sobre la So y la S1P. So y Cer son inductores de muerte celular (B y D), mientras que S1P, C1P y Glu-Cer promueven la sobrevida celular. **Fuente:** adaptado de Pralhada Rao *et al.* (2013) y Kroll *et al.* (2020) (A – F) (62, 63).

Estos SL de actividades antagónicas se pueden interconvertir mediante reacciones que están estrictamente reguladas, estableciendo así lo que se conoce como “reóstato de SL”, cuya manipulación se ha propuesto como un enfoque prometedor para la terapia tumoral (110, 111). Pequeños cambios en la regulación del reóstato podrían dictar el destino celular, haciendo de la vía de los SL un medio para inducir la muerte de las células de cáncer (Figura 13) (65).

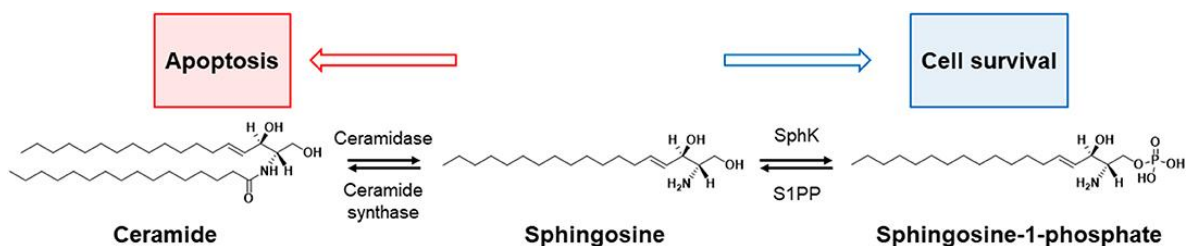


Figura 13. Reóstato de esfingolípido (SL). El balance entre la sobrevivida y la muerte celular (apoptosis) en la vía de SL es controlada por cuatro enzimas principales: esfingosina quinasa (SphK), esfingosina-1-fosfato fosfatasa (S1PP), ceramidasa y ceramida sintasas (CerS). El incremento de Cer desencadena que el reóstato se regule hacia apoptosis y, el incremento hacia precursores apoptóticos (como S1P) desencadena que el reóstato se regule hacia sobrevivida. **Fuente:** tomado de Kroll *et al.* (2020) (62).

Estudios previos han identificado la desregulación de los SL en diversas neoplasias malignas en conjunto con drogas quimioterapéuticas. Un hallazgo importante es que, aunque la Cer se convierte directamente en S1P, una pequeña conversión en la Cer celular aumenta exponencialmente el nivel de S1P, por lo que el reóstato es un equilibrio delicado y crítico que controla el destino celular (33). Por ejemplo, en pacientes con cáncer de próstata, los niveles de S1P y SphK1 se han identificado como biomarcadores altamente sensibles y específicos. El aumento de los niveles plasmáticos circulantes de S1P y el aumento de la actividad de SphK1 se correlacionaron significativamente tanto con el grado de diagnóstico del cáncer de próstata como con el pronóstico (112). Se demostró que los pacientes con carcinoma hepatocelular tenían un aumento de SphK1/2 en comparación con los pacientes no cancerosos y, un aumento de SphK1 específicamente se asoció con un peor pronóstico (53, 62).

Además, se han identificado alteraciones en el metabolismo de la Cer como mecanismos moleculares muy importantes para la resistencia a la quimioterapia. Por ejemplo, el aumento de los niveles de Glu-Cer se ha asociado con resistencia a múltiples fármacos (113, 114). Muchos modelos experimentales de estas alteraciones relacionadas con

la sensibilidad o la resistencia a los medicamentos han ayudado a dilucidar cómo las señales de estrés ejercidas por diferentes fármacos quimioterapéuticos o ligandos de la muerte son detectadas y transducidas por diferentes reacciones enzimáticas dentro de la vía de los SL (115). Por lo tanto, se ha propuesto que las estrategias quimioterapéuticas se diseñen para considerar las interacciones dirigidas a aumentar los niveles de Cer mediante los tratamientos con multidrogas para superar la resistencia (116, 117) o mediante la intervención directa sobre las enzimas de la vía de los SL (79, 110).

Por consiguiente, la vía de señalización de los SL es un sistema biológico complejo capaz de integrar diferentes tipos de señales de estrés celular y generar fenotipos dinámicos relacionados con la inducción de vías de muerte celular (103). Aunque la vía de los SL es bien conocida en la literatura, los efectos de la quimioterapia sobre la señalización asociada con la vía de los SL y sus relaciones cuantitativas de la muerte o supervivencia celular no están claros. Es por lo anterior, que se ha sugerido el uso de un análogo de SL fluorescente para revelar algunas propiedades básicas de esta vía y para comprender las conexiones entre las perturbaciones quimioterapéuticas y el destino celular (65).

2.7 Esfingolípidos con sonda BODIPY

El metabolismo de los SL produce componentes clave de la membrana (por ejemplo, SM) y una variedad de lípidos de señalización con diferentes funciones biológicas. La actividad coordinada de decenas de enzimas diferentes mantiene los niveles y la localización adecuados de estos lípidos con funciones clave en los procesos celulares (118). El metabolismo anormal de los SL se asocia con varias enfermedades, como el cáncer, la diabetes, los trastornos metabólicos y las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer. Sin embargo, el estudio directo de los SL se ha visto obstaculizado por su presencia ubicua en las células y su complejo metabolismo. En las últimas décadas, los esfuerzos se han centrado en la creación de sondas sintéticas y herramientas químicas para estudiar la ruta metabólica de los SL y descifrar sus funciones en la biología celular (119).

Los lípidos son los compuestos estratégicos para la obtención de imágenes, debido a su alta concentración en las membranas celulares. Es por esto que se han desarrollado herramientas que permiten el uso de lípidos en imágenes a nivel celular, para observar el tráfico de lípidos entre orgánulos y visualizar los límites de los lípidos con alta resolución espacial. Se han diseñado análogos de SL marcados con fluoróforos y se utilizan ampliamente como sondas de lípidos para estudiar la localización subcelular y el metabolismo de SL mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes en tiempo real y el seguimiento de SL marcados con fluorescencia proporcionan información sobre las actividades biológicas de los lípidos en un entorno natural (119, 120).

Lipsky y Pagano (121, 122) fueron pioneros en la investigación sobre la localización de SL en compartimentos celulares utilizando un análogo de Cer fluorescente, C6-NBD-Cer, con el cual pudieron observar la distribución intracelular del análogo y su metabolito, obteniendo información sobre el metabolismo de la Cer. Desde entonces, las sondas de SL marcadas con varias opciones de fluoróforos como nitrobenzofurazan (NBD), boro-dipirrometeno (BODIPY), rojo Nilo y polienos (123), que difieren en estructura química y propiedades espectrales (119).

Los análogos de SL marcados con BODIPY (como BODIPY 540 Sph), una sonda de SL con fluoróforos de longitud de onda más larga, fue diseñada para evitar interferir con la proteína fluorescente verde (GFP), cuya emisión se superpone con la de BODIPY (119, 124).

Los SL análogos a SM fluorescente (SM-BOD) se pueden usar como una herramienta para monitorear la actividad de la vía de los SL en células individuales. De hecho, los análogos de SL fluorescentes se han utilizado ampliamente en estudios de transporte de SM y la caracterización de su metabolismo (125).

La implementación de un análogo de SM acoplado químicamente con el grupo fluorescente BODIPY es usual como sensor para monitorear la respuesta celular a perturbaciones conocidas y a drogas quimioterapéuticas. Este método de estudio de la vía de los SL se realiza mediante imágenes analizadas para extraer parámetros de forma, tamaño, textura, intensidad de la fluorescencia de cada célula, entre otros; dichos parámetros se utilizan para identificar subpoblaciones con algoritmos matemáticos de modelos de mezclas

Gaussianas (*Gaussian Mixture Models* -GMM), ya reportados para el estudio de heterogeneidad en cáncer (3). La clasificación de las células en estas subpoblaciones permite caracterizar el patrón de heterogeneidad basal y sus cambios ante diversas perturbaciones.

Dentro de las ventajas de este método de estudio de la vía de los SL se incluye la similitud en el comportamiento al compararlo con el SL endógeno, el desarrollo de una estrategia para inferir el mecanismo de perturbaciones desconocidas comparadas con otras conocidas, la decodificación de las alteraciones utilizando un modelo matemático híbrido (modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) y modelo de lógica difusa (FLM)) que relaciona diferentes especies de la vía de SL con viabilidad celular para generar hipótesis de perturbaciones dobles que permitan superar la resistencia a quimioterapia (3).

Pese a las ventajas de estos sensores, el uso de análogos de SL acoplados a grupos voluminosos fluorescentes como BODIPY presenta una limitación, ya que el efecto estérico de este grupo altera la actividad biológica del SL comparado con el SL endógeno (126) y esto se traduce en limitaciones como sensor de respuesta celular (Figura 14).

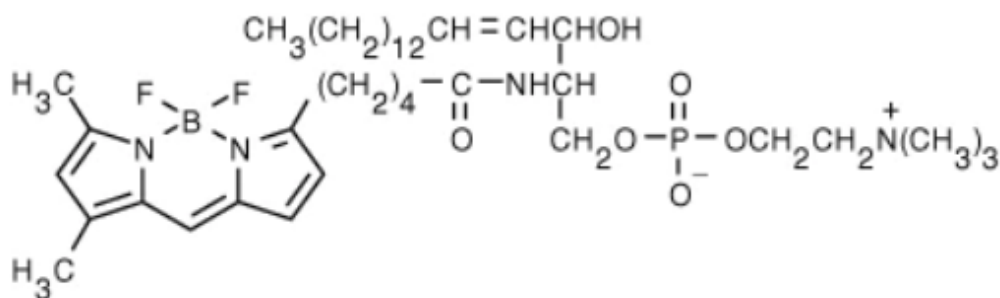


Figura 14. Estructura del análogo de esfingomielina fluorescente (SM-BOD). El lípido fluorescente análogo a esfingomielina (SM) unido al fluoróforo BODIPY, el grupo voluminoso y de anillos aromáticos que se encuentra a la izquierda de la figura. **Fuente:** tomado de ThermoFisher® (127).

Debido a que los análogos fluorescentes de SL contienen fluoróforos voluminosos de diferente hidrofobicidad, es probable que no sean los mejores emuladores de sus contrapartes naturales. Por ejemplo, difieren en términos de la permeabilidad de su membrana y no son

fácilmente reconocidos por la maquinaria celular involucrada en el metabolismo y el tráfico de lípidos. Estos cambios pueden causar problemas con la precisión de la localización de las sondas de SL (128). Por lo tanto, los análogos de SL marcados con fluorescencia proporcionan información limitada sobre el metabolismo endógeno de SL. Para abordar esta limitante, los científicos utilizan análogos de SL mínimamente modificados que pueden acoplarse a fluoróforos mediante reacciones químicas de *click* después de ingresar a la célula y desarrollan enfoques innovadores para detectar SL endógenos (119). Sin embargo, para este estudio, se limitó al uso de la sonda BODIPY para el análisis de imágenes por microscopía de fluorescencia.

2.8 Autofagia y su relación con el metabolismo de esfingolípidos

La autofagia es un proceso de degradación intracelular, que está altamente conservado entre todos los eucariotas (129). En este proceso, las células reciclan materiales intracelulares para mantener la homeostasis en diferentes contextos celulares. En condiciones basales previene la acumulación de proteínas y orgánulos dañados; durante la inanición, la autofagia proporciona a las células suficientes nutrientes para sobrevivir (130).

En general, la vía de degradación autofágica incluye cinco pasos esenciales: (1) la formación de una estructura de doble membrana (también denominada membrana de aislamiento), (2) encapsulación de la carga intracelular, (3) formación del autofagosoma (AP) maduro, (4) fusión con un lisosoma, y (5) degradación lisosomal de la carga (Figura 15). Cada uno de estos pasos está regulado y es efectuado por una serie de proteínas relacionadas con la autofagia (131), las cuales, forman complejos y tienen funciones propias en el proceso de autofagia (129).

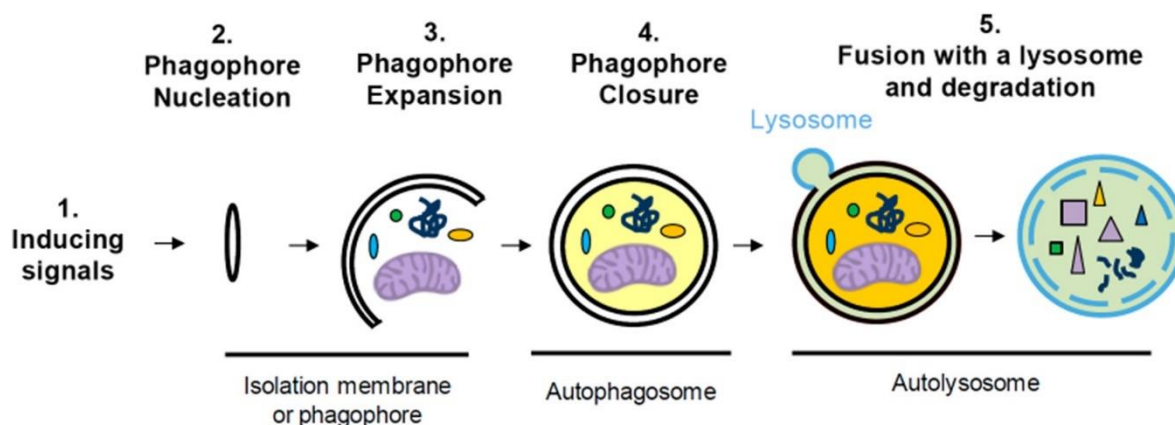


Figura 15. Esquema general de la (macro) autofagia en eucariotas. Los autofosomas (AP) son vesículas de doble membrana formadas por la expansión de una membrana de aislamiento (o fagóforo) alrededor del material citoplasmático seleccionado o en masa. La fusión de la membrana externa con un lisosoma (en azul) es en última instancia, responsable de la liberación de enzimas lisosomales entre las membranas interna y externa y de la degradación de la membrana interna y su contenido. A partir de la fusión con lisosomas, los AP se convierten en autolisosomas. **Fuente:** tomado de Varela *et al.* (2024) (132).

El proceso inicia con la creación de una estructura de doble capa conocida como AP (133), mediante la formación de una "membrana de aislamiento" o fagóforo. El origen de la membrana inicial sigue siendo desconocido, aunque las fuentes potenciales podrían incluir el ER, el compartimento intermedio ER-Golgi, los endosomas, la membrana celular externa o incluso las mitocondrias (134). El mecanismo exacto por el cual el fagóforo se agranda y evoluciona hacia el AP sigue siendo difícil de comprender. Para que el AP crezca, las membranas deben adherirse, fusionarse y recibir lípidos de las membranas del donante (135). A medida que el fagóforo toma forma, los componentes celulares destinados a la degradación comienzan a acercarse a él. En última instancia, el AP se sella y, cuando se fusiona con un lisosoma, las enzimas lisosomales descomponen su materia interna (Figura 15) (132).

Además de estas funciones ya descritas de los SL, se ha identificado que algunos SL como Cer, SIP o los gangliósidos promueven la autofagia en varias líneas celulares cancerosas. La evidencia actual respalda la idea de que la inducción de la muerte celular

autofágica puede detener la tumorigénesis. Es interesante señalar que algunos agentes quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento de neoplasias hematológicas desencadenan la producción de SL endógenos con efectos pro-autofágicos (130).

Debido a la implicación de la autofagia en muchas enfermedades, existe un gran interés en identificar fármacos que puedan usarse para manipular la autofagia con fines terapéuticos. Un paso importante hacia este objetivo es establecer ensayos y sistemas de detección donde el flujo autofágico pueda medirse de forma rápida y precisa en respuesta a los fármacos. El flujo autofágico se refiere al proceso completo de autofagia ya descrito anteriormente (Figura 15) (136).

Según Hundeshagen *et al.* (2011), el uso de sondas fluorescentes en tándem con sensibilidad diferencial al pH permite diferenciar los efectos sobre la actividad lisosomal de los efectos sobre la formación de autofagosomas para modular la autofagia (137).

Para la modulación de la actividad autofágica se emplea la proteína marcadora de autofagia LC3, la cual es un homólogo (mamífero) de la proteína ATG8 de levadura, una proteína semejante a la ubiquitina que se lipida y se asocia estrechamente con las membranas autofagosómicas. Adicionalmente, la proteína LC3 es relevante en procesos de autofagia selectiva, mediante la eliminación de componentes intracelulares como agregados de proteínas, orgánulos y patógenos (136, 138).

Hundeshagen *et al.* (2011), indican que la cuantificación de AP se puede realizar mediante la fusión de sondas fluorescentes en tándem: mCherry insensible a los ácidos, y GFP (proteína verde fluorescente) sensible a los ácidos (137). Con estas sondas se mide la intensidad fluorescente cuando se someten células ante activadores e inhibidores de autofagia para medir la formación de autolisosomas y su degradación en una población celular (Figura 16) (136, 137).

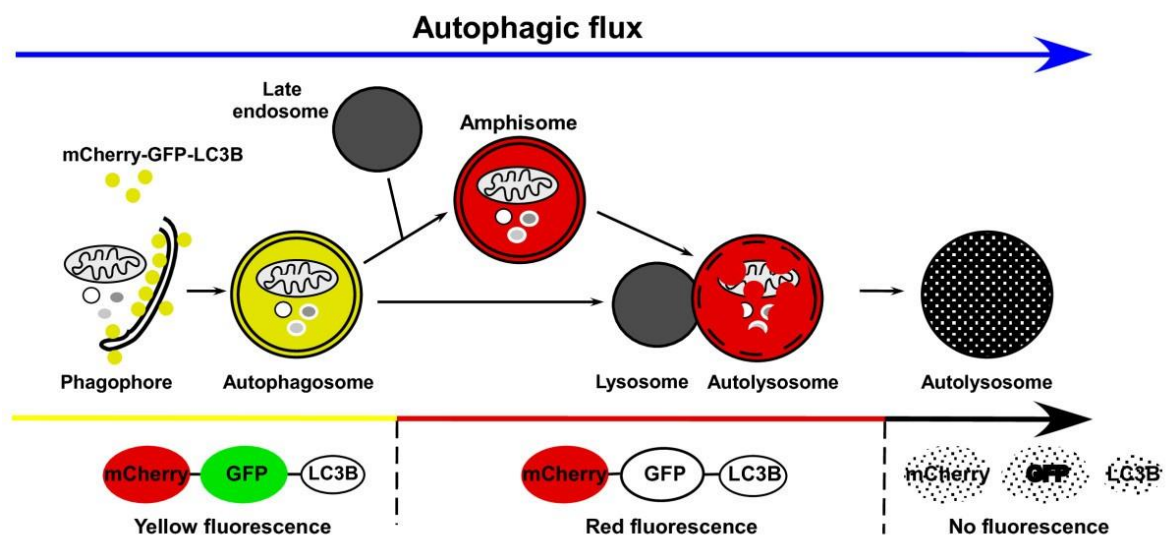


Figura 16. Rastreo del flujo autofágico con *double-tagged* LC3B. Mediante una fusión en tándem de las sondas mCherry y GFP con LC3B (uno de los varios miembros de la familia LC3 de mamíferos) para generar una sonda sensible al pH que permite monitorear la autofagia en células vivas. La sonda GFP es sensible a los ácidos, mientras que la sonda mCherry no lo es. El LC3 con doble etiqueta (*double-tagged LC3B*) permite el marcaje de AP, anfisomas y autolisosomas. En los AP, ambas sondas emiten luz fluorescente que da como resultado una fluorescencia amarilla. Sin embargo, la fusión de AP con endosomas tardíos o lisosomas, da como resultado anfisomas o autolisosomas ácidos donde se pierde la fluorescencia verde de la GFP. Posteriormente, la fluorescencia roja de mCherry se pierde cuando se degrada la proteína LC3B con doble etiqueta (*double-tagged LC3B*). **Fuente:** tomado de Hansen y Johansen (2011) (136).

Es posible monitorear la vía autofágica debido al bajo pH del autolisosoma, la fluorescencia verde de GFP (sensible a los ácidos) se pierde al fusionarse el autophagosome con el lisosoma, pero la fluorescencia roja de mCherry (insensible a los ácidos) no se pierde hasta que las proteínas se degradan en el autolisosoma. (136, 137).

2.9 Usos del marcador de autofagia LC3-GFP-m-Cherry en la investigación de terapias contra el cáncer

Los fármacos quimioterapéuticos son la estrategia más utilizada contra el cáncer, a pesar de provocar múltiples efectos adversos y tener bajas respuestas con una tasa promedio de supervivencia de los pacientes a 5 años del diagnóstico. Con el fin de implementar nuevas terapias, se han desarrollado investigaciones previas que abordan la posibilidad de asociar la regulación del proceso metabólico de la autofagia y la exposición de patrones moleculares asociados al daño (DAMP) involucrados en la muerte celular inmunogénica (ICD) (139).

Para esto, se valida la capacidad de un sensor recombinante en tándem con mCherry y GFP (m-Cherry – GFP) unido a la proteína LC3 para responder ante cambios dinámicos del flujo metabólico autofágico al exponerlo a estímulos externos y demostrar que tanto los niveles basales de autofagia como la respuesta a diversos moduladores de esta vía son fluctuantes entre diferentes líneas celulares, explorando la sinergia de estas combinaciones en términos de citotoxicidad e ICD en líneas celulares de cáncer (139).

Según Quiros-Fernandez *et al.* (139), las sinergias reportadas son complejas y variables en diferentes líneas celulares; sin embargo, las estrategias de modulación reportadas para mejorar la respuesta a la quimioterapia indican un potencial terapéutico prometedor de la regulación del metabolismo autofágico para superar la resistencia a la quimioterapia mediante la activación de ICD.

CAPÍTULO III. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Justificación del Proyecto de Investigación

Según los reportes del Registro Nacional de Tumores, de la Dirección de Vigilancia de la Salud del Ministerio de Salud de Costa Rica (MS) y del Instituto Nacional de Estadística y Censos de Costa Rica (INEC), anualmente se diagnostican más de 11500 casos de tumores en Costa Rica y el cáncer ocasiona la muerte a más de 5000 costarricenses cada año (140). La tendencia es que la incidencia de esta patología va en aumento, y actualmente se considera que es la segunda causa de muerte en la población adulta de Costa Rica precedido por las enfermedades cardiovasculares.

Se han implementado pruebas basadas en ensayos de cultivo *in vitro* para la personalización de la quimioterapia contra el cáncer, en los cuales las células tumorales son expuestas a diferentes drogas quimioterapéuticas para determinar la viabilidad celular que se correlaciona con el grado de resistencia, con el fin de obtener el perfil de resistencia o sensibilidad para cada paciente. No obstante, aunque estos ensayos tienen valores predictivos altos, omite la heterogeneidad celular dentro de los tumores (4).

Por lo anterior, se propone monitorear los diversos aspectos celulares relacionados con la respuesta a la quimioterapia en células individuales, incluyendo sensores del metabolismo de SL (141). La importancia de este proyecto radica en identificar las combinaciones de drogas quimioterapéuticas y perturbaciones (inhibidores de la vía de los SL y moduladores de la autofagia) que puedan tener un efecto sinérgico para evaluar el destino celular con un enfoque terapéutico en modelos celulares de cáncer de pulmón y mama.

Asimismo, se pretende estudiar el metabolismo de los esfingolípidos para identificar patrones de heterogeneidad del tumor como sensor de respuesta a la dinámica de SL, el flujo autofágico y la citotoxicidad, como estrategia para la terapia personalizada de cáncer, orientada por ensayos de quimiosensibilidad tumoral *in vitro*.

La propuesta de investigación planteada permite comprobar el potencial de los SL como sensores de respuesta a la quimioterapia y como sensores capaces de evaluar los mecanismos de acción de drogas desconocidas para el descubrimiento de potenciales aplicaciones terapéuticas que permitan superar la resistencia a la quimioterapia.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Evaluar las interacciones quimioterapéuticas con inhibidores de la vía de esfingolípidos y moduladores de la autofagia en un modelo celular de cáncer de pulmón (A549) y mama (MCF-7) marcado con un análogo de esfingomielina fluorescente (SM-BOD) y el sensor recombinante LC3/m-Cherry (mCherry-EGFP-LC3B) para monitorear el metabolismo de esfingolípido, el flujo autofágico y la citotoxicidad, mediante microscopía de fluorescencia.

3.2.2 Objetivos Específicos

3.2.2.1 Realizar un ensayo celular en presencia de perturbaciones simples y dobles de tratamiento quimioterapéutico, moduladores de la autofagia e inhibidores de la vía de los esfingolípidos para cuantificar la citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer de pulmón y mama (A549 y MCF-7, respectivamente), mediante microscopía de fluorescencia.

3.2.2.2 Cuantificar la fluorescencia en un modelo celular de cáncer de pulmón y mama (A549 y MCF-7) marcado con un análogo de esfingomielina fluorescente (SM-BOD) y elaborar un *pipeline* de análisis de imágenes para caracterizar la respuesta celular a perturbaciones a la vía de esfingolípidos y al flujo autofágico.

3.2.2.3 Evaluar el comportamiento de las interacciones entre las quimioterapias, moduladores de la autofagia e inhibidores de la vía de esfingolípidos en un modelo matemático de mezclas gaussianas (GMM) para plantear un modelo topológico del destino metabólico del análogo fluorescente (SM-BOD).

3.2.2.4 Comprobar experimentalmente la presencia de interacciones sinérgicas entre la vía de los esfingolípidos y la autofagia, que estimulan la formación de autofagosomas en las líneas celulares, mediante microscopía de fluorescencia.

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se describe en esta sección se basa en una publicación previa (Quiros *et al.* (2018) y Molina *et al.* (2018)) que ha sido adaptada para el procedimiento de las líneas celulares A549 de cáncer de pulmón y MCF-7 de cáncer de mama (65, 125).

4.1 Cultivos celulares

4.1.1 A549 *wild-type* (A549 – WT)

Para evaluar la cinética de la vía de los esfingolípidos y la interacción esfingolípido-proteína, se cultivaron células A549 – WT de un carcinoma humano de pulmón procedente del panel NCI – 60. Las células de cáncer de pulmón se cultivaron en medio RPMI (1640 Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU) suplementado con 10% de suero de fetal bovino (FBS Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, EE.UU), 1% de penicilina, estreptomicina y anfotericina B (Anti-Anti Gibco, Life Technologies, Roskilde, Denmark) y 1% L-alanina-L-glutamina (GlutaMAX Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU). El cultivo se incubó a 37 °C (5% CO₂) y la disociación de células adheridas se realizó con tripsina (TryPLE™ Express Gibco, Life Technologies, Roskilde, Denmark) por un máximo de ocho pasajes celulares, para evitar la selección de subpoblaciones (65, 142).

4.1.2 MCF-7 *wild-type* (MCF-7– WT)

Adicionalmente, del panel NCI-60 se cultivó la línea celular MCF-7–WT de cáncer de mama en medio RPMI (1640 Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU) suplementado con 10% de suero de fetal bovino (FBS Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, EE.UU), 1% de penicilina, estreptomicina y anfotericina B (Anti-Anti Gibco, Life Technologies, Roskilde, Denmark) y 1% L-alanina-L-glutamina (GlutaMAX Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU). El cultivo se incubó a 37 °C (5% CO₂) y la disociación de células adheridas se realizó con tripsina (TryPLE™ Express Gibco, Life Technologies, Roskilde, Denmark) (65, 142).

4.2 Preparación de las células de cáncer con la tinción fluorescente SM-BOD

4.2.1 Siembra de células de cáncer de mama y pulmón (MCF-7– WT y A549 – WT)

La cinética fluorescente del sensor SM-BOD (BODIPY FL C5 SPHINGOMYELIN Molecular Probes, Invitrogen™, Eugene, OR, EE.UU) en las células de cáncer de mama y pulmón se evaluó usando una placa de cultivo de 96 pozos en la que se sembró un volumen de 100 μL /pozo de la suspensión de células (A549 – WT y MCF-7 – WT) con un contenido de 1.5×10^5 células/mL. Después, a la placa se le adicionaron 100 μL /pozo de tratamiento (inhibidores de la vía de los esfingolípidos y quimioterapias) o medio de cultivo (controles) y se incubó por un periodo de 24 horas a 37 °C y 5% CO₂, para promover la adhesión celular (142, 143).

4.2.2 Medio de tinción

Posterior al tiempo de incubación, se removió el medio de cultivo de los pozos de la placa de 96 hoyos y se agregó a cada pozo 50 μL de RPMI no suplementado (0% FBS, 1% anti-anti, 1% GlutaMAX) con 2 μM de la sonda SM-BOD y 3,8 $\mu\text{g/mL}$ de Hoechst para teñir los núcleos celulares (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, EE.UU). Esta tinción se incubó por 10 min a 37 °C y 5% CO₂ y posteriormente, se realizaron dos lavados con 100 μL de medio RPMI no suplementado, para evitar la sobretinción celular (142).

4.2.3 Medio de lectura

Seguidamente, se añadió a la placa de cultivo 50 μL de medio de lectura: medio RPMI suplementado con 1% FBS (1% FBS, 1% anti-anti, 1% GlutaMAX) y 0,02 mg/mL de yoduro de propidio (PI, Molecular Probes, Life Technologies) para evaluar la muerte celular.

Las condiciones de concentración de SM-BOD, Hoeschst, FBS y PI en el medio de tinción y medio de lectura, fueron previamente estandarizadas para obtener imágenes de alta definición en el microscopio de fluorescencia y reducir al mínimo el ruido de fondo (143).

4.2.4 Tratamientos y controles

Se diseñó un ensayo de viabilidad celular para evaluar las sinergias de perturbaciones dobles y simples (Figura 18), para lo cual se añadió al medio de lectura otros 50 μL por pozo de tratamiento (inhibidores de la vía de los SL, moduladores de autofagia, y quimioterapias) o medio de cultivo (controles).

Los tratamientos dobles fueron combinaciones de quimioterapias y perturbaciones (inhibidores de la vía de los SL o moduladores de autofagia). Las enzimas inhibidoras de la vía de los SL estudiadas fueron: SKI (inhibidor de la esfingosina quinasa II, 4.13 μM , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU), PDMP (inhibidor de la glucosilceramida sintasa, 29.26 μM , ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, EE.UU), Des (Desipramina, inhibidor de la esfingomielinasa ácida y ceramidasa ácida, 10.32 μM , ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, EE.UU), NCI (inhibidor de la ceramidasa neutra/alcalina, 110.62 μM , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU), D609 (inhibidor de la esfingomielina sintasa, 187.62 μM , ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, EE.UU), ACI (inhibidor de la ceramidasa ácida, 5.92 μM , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU), GW (inhibidor de la esfingomielinasa neutra, 1.16 μM , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU), y Myr (miriocin, inhibidor de serina palmatoil-transferasa, 12.46 μM , EMD Millipore Corporation, Danvers, MA, EE.UU).

Los moduladores de autofagia estudiados son: RAP (rapamicina, 1.00 μM , Sigma-Aldrich), HCQ (hidroxicloroquina-1, 25.00 μM , Sigma-Aldrich), SPA (espautina-2, 40.00 μM , Sigma-Aldrich), y TOR (Torin-2, 1.00 μM , Sigma-Aldrich).

Las drogas quimioterapéuticas evaluadas incluyen: EPI (epirrubicina, 0.58 μM , Sandoz, Viena, Austria), CIS (cisplatino, 13.32 μM , Pfizer, Sydney, Australia), y PAC (paclitaxel, 1.76 μM , AqVida, Hamburg, Germany). Se estudiaron estas tres quimioterapias por los resultados preliminares obtenidos, con las cuales se obtuvo las mejores sinergias (ver anexo 1).

4.3 Evaluación del metabolismo de SM-BOD con células A549– WT y MCF-7– WT

Para monitorear el comportamiento del sensor SM-BOD frente a diferentes perturbaciones en las líneas celulares de cáncer de pulmón y mama, se adquirieron imágenes de fluorescencia cada 6 h durante 72 h, utilizando microscopía de fluorescencia automatizada (Cytation 3™, Biotek, Winooski, VT, EE. UU.) con canales DAPI, Texas Red y GFP (Figura 19). Además, se realizó un *pipeline* para el análisis automático de imágenes con el *software* CellProfiler 4.1.3 (www.cellprofiler.org), señalado en el anexo 2, con el cual se obtuvieron 153 características de fluorescencia con resolución unicelular, incluidas características de textura, morfología e intensidad; asimismo, este protocolo estimó la citotoxicidad para cada perturbación utilizando la tinción PI para evaluar sinergismos o antagonismos de los tratamientos dobles estudiados.

Según los datos de citotoxicidad obtenidos del *software* CellProfiler, fue posible obtener valores sinérgicos o antagónicos (que se muestran en la Figura 18) utilizando las siguientes ecuaciones (144):

$$\text{Citotoxicidad experimental (\%)} = \frac{\text{células muertas}}{\text{células totales}} \quad (1)$$

$$\text{Viabilidad experimental (\%)} = 100 - (\text{citotoxicidad experimental \%}) \quad (2)$$

$$\text{Viabilidad esperada (\%)} = \frac{\text{viabilidad individual}_1 (\%) * \text{viabilidad individual}_2 (\%)}{100} \quad (3)$$

$$\text{Interacción doble (\%)} = (\text{viabilidad esperada}) - (\text{viabilidad experimental}) \quad (4)$$

$$\text{Razón de la interacción} = \frac{\text{interacción doble (\%)}}{100} \quad (5)$$

4.4 Topología modelo para el destino metabólico de SM-BOD

Se aplicó un algoritmo de máquina de vectores de soporte en el *software* R Studio 8.13 para reducir las características relacionadas con la sonda de fluorescencia y los atributos nucleares del protocolo experimental. El algoritmo permitió la extracción y organización de las características según el nivel de significancia.

Con las características seleccionadas, se aplicó un modelo matemático GMM (Figura 20) en el *software* MATLAB 9.8 (145) para identificar el comportamiento de los fármacos quimioterapéuticos en la vía SL, comparando su efecto sobre el perfil de heterogeneidad celular con el efecto producido por inhibidores conocidos de la vía metabólica de SL (65).

El perfil de heterogeneidad celular proporcionó la información para realizar *clusters* y asociar diferentes perturbaciones en un dendrograma, en el que fue posible definir interacciones dobles para identificar sinergismos y antagonismos. Ese perfil permite inferir cómo los agentes quimioterapéuticos y los inhibidores perturban la vía de los SL, con el fin de sugerir una topología de red de la vía de SL para la línea celular de cáncer de pulmón A549 basada en el metabolismo de la sonda SM-BOD (Figura 21).

4.5 Ensamblaje del vector retroviral mCherry-EGFP-LC3B

Para validar los resultados del apartado anterior (Figura 21), se debe generar una línea celular estable A549 mCherry-EGFP-LC3B marcadas con SM-BOD. Para este fin, las partículas retrovirales se generaron en monocapas de células A549 confluentes al 60% mediante transfección triple con polietilenimida (Polysciences 23966) del plásmido de transferencia pBABE-puro mCherry-EGFP-LC3B (146) (proporcionado por Jayanta Debnath, plásmido Addgene #22418), el plásmido empaquetador pCL-Eco (proporcionado por Inder Verma, plásmido Addgene #12371) y el plásmido de envoltura pMD2.G (proporcionado por Didier Trono, plásmido Addgene #12259) (147). A las 72 h después de la transfección, se colectaron los medios que contenían virus, se filtraron a través de una membrana de poro de 0,45 μm , se suplementaron con 5 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno (Sigma H9268, St. Louis, MO, EE. UU.) y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó el mismo procedimiento para obtener la línea celular estable de MCF-7.

4.6 Generación y clasificación de la línea celular estable A549 mCherry-EGFP-LC3B y MCF-7 mCherry-EGFP-LC3B (A549 – LC3/m-Cherry y MCF-7 – LC3/m-Cherry)

Las monocapas de las células A549 y MCF-7 (80% de confluencia) fueron transducidas con partículas retrovirales que portaban el constructo mCherry-LC3B y se centrifugaron durante 2 h a 453 g (25 °C). A las 72 h después de la transducción, las células se seleccionaron (*sorting*) con 4 µg/ml de puromicina (Sigma P8833) en RPMI 1640 con 10% FBS durante 2 días. Se aislaron las subpoblaciones celulares con niveles de expresión homogéneos del constructo mCherry-LC3B para cada línea celular mediante clasificación de células activada por fluorescencia en un *cell sorter* BD FACSJazz™ (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.). Las células clasificadas se cultivaron en RPMI 1640 con 10% FBS con 4 µg/ml de puromicina. La línea celular A549 mCherry-EGFP-LC3B permitió rastrear el proceso de autofagia en el ensayo cinético para el metabolismo de SL.

4.7 Evaluación experimental del proceso autofágico de las células estables A549 – LC3/m-Cherry

Para verificar el proceso autofágico presente en las células estables A549 – LC3/mCherry (generadas en las secciones 4.5 y 4.6), se realizó el cultivo de las células siguiendo el protocolo indicado en la sección 4.1. Posteriormente, se trataron con la sonda fluorescente SM-BOD añadiendo el medio de tinción y el medio de la lectura (sección 4.2) para el posterior tratamiento con la quimioterapia EPI y los moduladores autofágicos RAP y TOR, en su conformación de perturbación simple y doble. Lo anterior, debido a que el resultado mostrado en la Figura 21 indica que la interacción de EPI con estas perturbaciones promueve la activación del proceso autofágico mediante la formación de AP.

Posteriormente, con el ensayo completo, se procedió al monitoreo del comportamiento autofágico frente a las perturbaciones simples y dobles en las células estables A549 LC3/m-Cherry mediante la adquisición de imágenes en el microscopio de fluorescencia por un periodo de 24 h (como se describe en la sección 4.3), visualizando los canales DAPI, Texas Red y GFP (Figura 22).

CAPÍTULO V. RESULTADOS

5.1 La quimioterapia interactúa con moduladores de la autofagia e inhibidores de la vía de los esfingolípidos para modificar la citotoxicidad.

Para desarrollar los ensayos de viabilidad celular, se estableció un protocolo que permitiera determinar la mejor concentración de la sonda fluorescente en las líneas celulares de cáncer de mama y pulmón (MCF-7– WT y A549 – WT, respectivamente). Para este fin, se desarrolló un ensayo cinético en el que se evaluó la intensidad fluorescente de SM-BOD contra el tiempo de reacción metabólica mediante el análisis con microscopía de fluorescencia. La figura 17 muestra el comportamiento de diferentes concentraciones de la sonda basado en la intensidad integrada obtenida del análisis de imágenes con CellProfiler, de manera que se muestra la disminución o pérdida de la fluorescencia de la sonda en la línea celular A549 en el tiempo; mientras que la línea celular MCF-7 muestra constancia en la intensidad integrada fluorescente de la sonda SM-BOD. Estos resultados predicen que la línea celular A549 – WT logra metabolizar satisfactoriamente la concentración de 2 μ M de SM-BOD a lo largo de las 72 h del ensayo; por el contrario, la línea celular MCF-7 – WT mostró un comportamiento de intensidad fluorescente constante a lo largo de las 72 h de ensayo, lo cual puede indicar que el fluoróforo no logró metabolizarse.

Al no lograr la internalización celular de la sonda SM-BOD en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), se determinó que los resultados restantes del proyecto se iban a generar únicamente basados en la línea celular de cáncer de pulmón (A549).

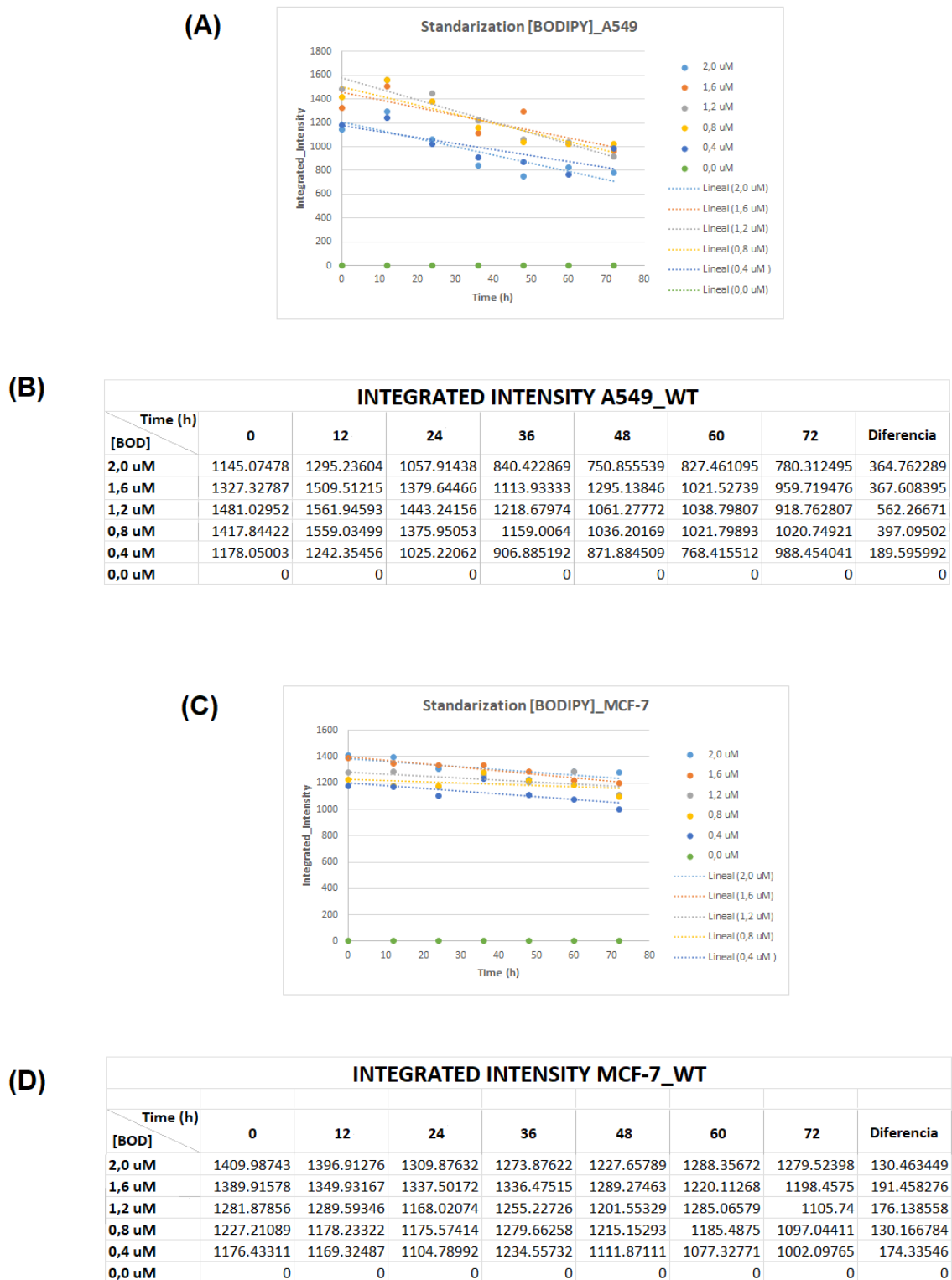


Figura 17. Ensayo cinético de la intensidad fluorescente contra el tiempo de reacción de la sonda fluorescente SM-BOD para las líneas celulares A549 y MCF-7 en su conformación

wild-type (WT), mediante microscopía de fluorescencia. (A) Curva cinética de la concentración de la tinción SM-BOD (intensidad integrada vs. tiempo) para la línea celular A549– WT; (B) Datos del comportamiento cinético de la sonda SM-BOD, basados en el comportamiento de la intensidad integrada expresada por el tratamiento de la línea celular A549– WT; (C) Curva cinética de la concentración de la tinción SM-BOD (intensidad integrada vs. tiempo) para la línea celular MCF-7– WT; (B) Datos del comportamiento cinético de la sonda SM-BOD, basados en el comportamiento de la intensidad integrada expresada por el tratamiento de la línea celular MCF-7– WT.

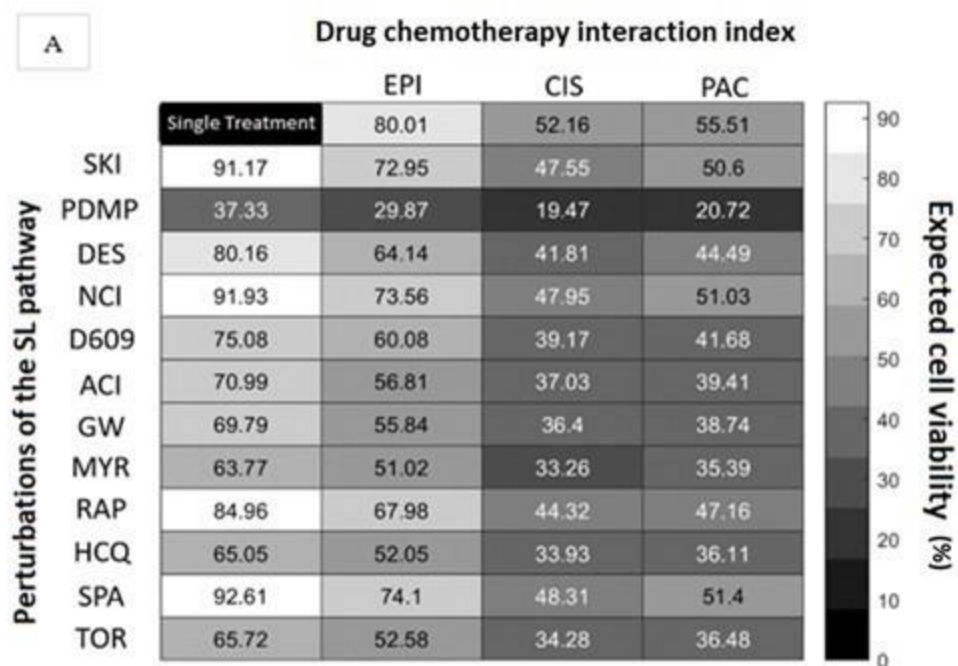
La viabilidad celular de las células de cáncer de pulmón A549– WT se obtuvo a partir de los datos de interacciones simples y dobles de los ensayos de citotoxicidad (Sección 4.3, Ecuaciones (1) a (5)). Los datos de viabilidad esperada y viabilidad experimental se muestran en la Figura 18A y 18B, respectivamente, para identificar interacciones sinérgicas y antagonistas para tratamientos dobles de perturbaciones-quimioterapia (Figura 18C).

Los resultados asociados con EPI indican que la interacción quimioterapia-modulador constituida por EPI – RAP mostró una sinergia importante que condujo a una disminución de la viabilidad al 14% (Figura 18B) en comparación con la viabilidad combinada esperada sin interacción de alrededor del 67% (Figura 18A). Según estos datos, se obtuvo un efecto sinérgico de 0,5 veces (Figura 18C), siendo la mayor interacción reportada en este resultado. Además, la sinergia de EPI – TOR y EPI – ACI fue de 0,4 para ambos casos, mientras que la interacción de EPI –NCI fue de 0,3 (Figura 18C). De esta manera, se sugiere que el mecanismo de acción de EPI interactúa a nivel de vía con la proteína inhibidora de mTOR (TOR – RAP) y con el inhibidor de la ceramidasa (ACI-NCI), desencadenando un efecto sinérgico significativo. También, se muestran varias interacciones sinérgicas más débiles para EPI con SKI, Des, D609, GW, Myr, HCQ y SPA. El tratamiento doble de EPI – PDMP no arrojó interacción y no se observó ningún efecto antagónico en los resultados reportados para EPI.

Por su parte, el fármaco quimioterapéutico CIS mostró la sinergia principal con el inhibidor de la ceramidasa neutra (NCI), con un aumento de 0,3 veces en comparación con

la citotoxicidad esperada (Figura 18C); las otras condiciones estudiadas mostraron interacciones sinérgicas más débiles. No se reportó interacción para la perturbación doble CIS – D609 y no se obtuvo ningún antagonismo en los resultados con esta quimioterapia.

El análisis con PAC demostró que la mayoría de las interacciones mostraron efectos antagonistas y, la interacción antagonista más fuerte fue -0,4 con SPA. También se detectaron dos sinergismos débiles con Des y GW (0,2 y 0,1, respectivamente).



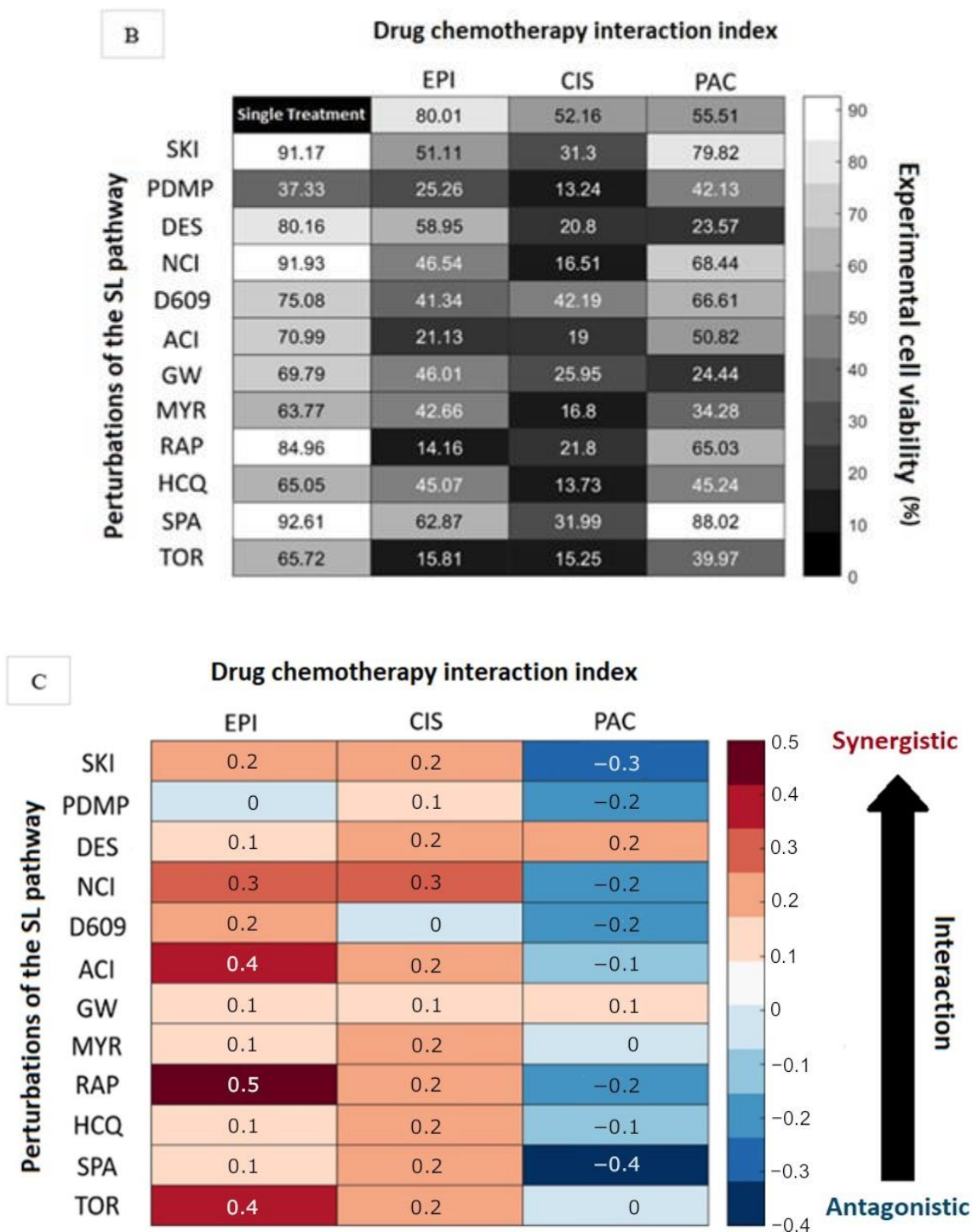


Figura 18. Análisis de viabilidad celular a las 48 h de la línea celular A549 – WT permite el reconocimiento de interacciones quimioterapia-inhibidor. (A) Porcentaje de viabilidad celular esperada para tratamientos simples y dobles; (B) porcentaje de viabilidad celular experimental para tratamientos simples y dobles; (C) interacciones sinérgicas y antagonistas

de fármacos quimioterapéuticos y perturbaciones de la vía de esfingolípidos (SL). Abreviaturas en la figura: EPI: epirrubicina; CIS: cisplatino; PAC: Paclitaxel; SKI: inhibidor de la esfingosina quinasa II; PDMP: inhibidor de la glucosilceramida sintasa; DES: desipramina, inhibidor de la esfingomielinasa ácida y ceramidasa ácida; NCI: Inhibidor de la ceramidasa neutra/alcalina; D609: inhibidor de la esfingomielina sintasa; ACI: inhibidor de la ceramidasa ácida; GW: inhibidor de la esfingomielinasa neutra; MYR: miriocin, inhibidor de la serina palmitoil-transferasa; RAP: rapamicina; HCQ: Hidroxicloroquina-1; SPA: Espautina-2; TOR: Torin-2.

Para desarrollar el análisis de imágenes para la extracción de características (*features*) con resolución unicelular, se diseñó un protocolo de segmentación de imágenes para evaluar el efecto de perturbaciones simples y dobles de la vía de SL (inhibidores o moduladores de la autofagia y fármacos quimioterapéuticos) en células individuales, utilizando el *software* CellProfiler. La Figura 19 muestra las imágenes segmentadas utilizando microscopía de fluorescencia para el modelo de células de cáncer de pulmón: los núcleos celulares reconocidos con sondas de Hoechst en el canal DAPI, PI en el canal Texas Red (Figura 19A) y la presencia de la sonda SM-BOD que se analizó en el canal GFP (Figura 19B). Estos resultados sugieren cambios asociados a perturbaciones en el metabolismo de SL que pueden monitorearse con resolución de una única célula, utilizando la sonda PI para marcar la muerte celular, Hoechst para marcar los núcleos celulares y un análogo fluorescente SM-BOD para rastrear el metabolismo de SL.

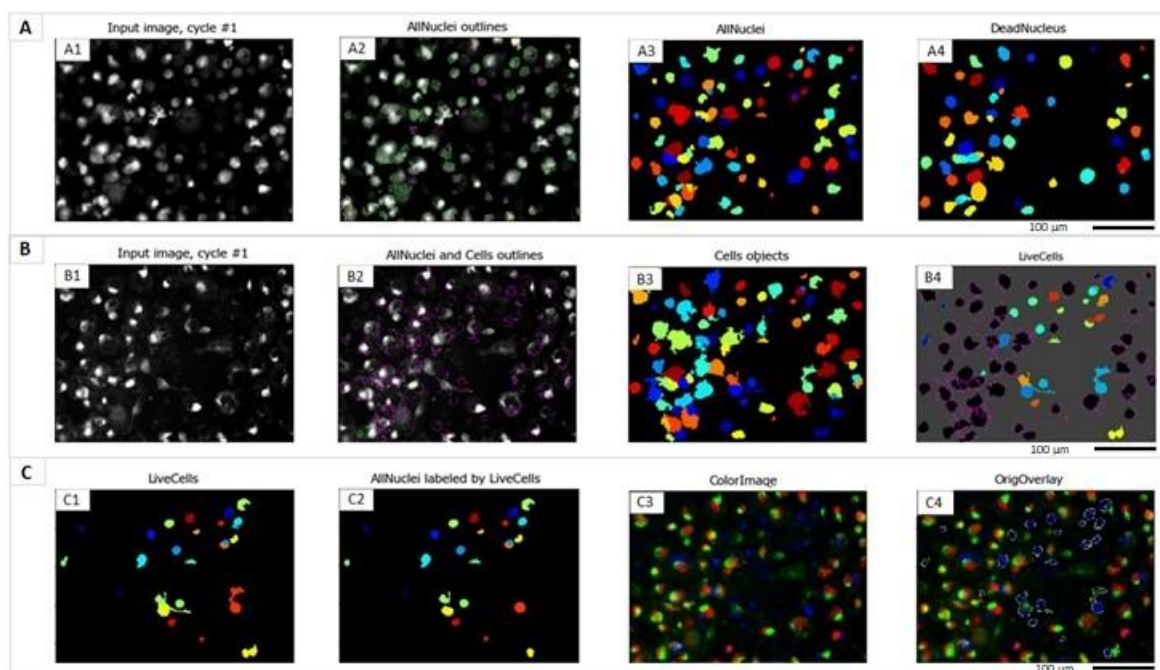


Figura 19. Análisis de imágenes para la segmentación subcelular (núcleos/citoplasmas) del modelo de células de cáncer de pulmón (A549 – WT) mediante microscopía de fluorescencia. (A) Análisis de núcleos teñidos con Hoechst y yoduro de propidio (PI) utilizando los canales DAPI y Texas Red, respectivamente; (A1) Núcleos de todas las células obtenido por la suma de la señal emitida por los canales DAPI y Texas Red; (A2) Reconocimiento nuclear mediante el protocolo diseñado utilizando el *software* CellProfiler; (A3) Identificación de núcleos de todas las células detectadas; (A4) Identificación de núcleos de células muertas en el canal Texas Red. (B) Análisis de la sonda BODIPY (SM-BOD) mediante el canal GFP; (B1) Esfingolípidos (SL) marcados con la sonda fluorescente; (B2) Reconocimiento de células completas mediante el protocolo diseñado con el *software* CellProfiler; (B3) Identificación de todas las células completas; (B4) Eliminación de células muertas (reconocidas en A4) de todas las células completas identificadas en B3 para obtener solo células vivas. (C) Análisis de viabilidad celular; (C1) Células viables completas; (C2) Núcleos de células viables; (C3) Imagen tricolor de señales de los canales DAPI, GFP y Texas Red para todas las células; (C4) Eliminación de células vivas de la imagen de las células completas reconocidas, para identificar la superposición de células muertas. Escala: 100 µm.

5.2 Un modelo de mezclas Gaussianas de perfiles de heterogeneidad del destino metabólico de un análogo de esfingomielina fluorescente sugiere la base mecanicista de las interacciones mapeadas en la vía de esfingolípidos.

Se aplicó un algoritmo de “máquina de vectores de soporte” (*software* R) para seleccionar y organizar *features* extraídos del análisis de imágenes (Sección 4.4). Se realizó un modelo GMM, mediante el *software* MATLAB, para establecer un perfil de heterogeneidad para inferir el efecto de perturbaciones desconocidas en la vía de SL (quimioterapias). Se seleccionaron 109 *features* de fluorescencia de un total de 153 *features* extraídos mediante microscopía de fluorescencia. Los conjuntos de datos celulares para todas las condiciones se fusionaron en un solo conjunto de datos para identificar el número máximo de subpoblaciones con distribución normal (65) (Figura 20A-D). Para ello, se identificó un número óptimo de nueve subpoblaciones significativas mediante la prueba de MANOVA ($p < 0,5$, Figura 20A y 20B). De este modo, mediante un perfil de heterogeneidad se determinó la frecuencia de las células (Figura 20F) que se agrupan en cada una de esas subpoblaciones con el perfil producido por una perturbación conocida (Figura 20E). EPI – ACI, EPI – NCI, CIS – PDMP, HQC – SPA y RAP – TOR fueron las interacciones quimioterapia-inhibidor que se mapearon juntas debido a las similitudes en sus perfiles de heterogeneidad. Esto permitió predecir que la influencia de esos agentes quimioterapéuticos en la vía metabólica de SM-BOD es semejante a la de los correspondientes inhibidores de las enzimas de la vía de SL.

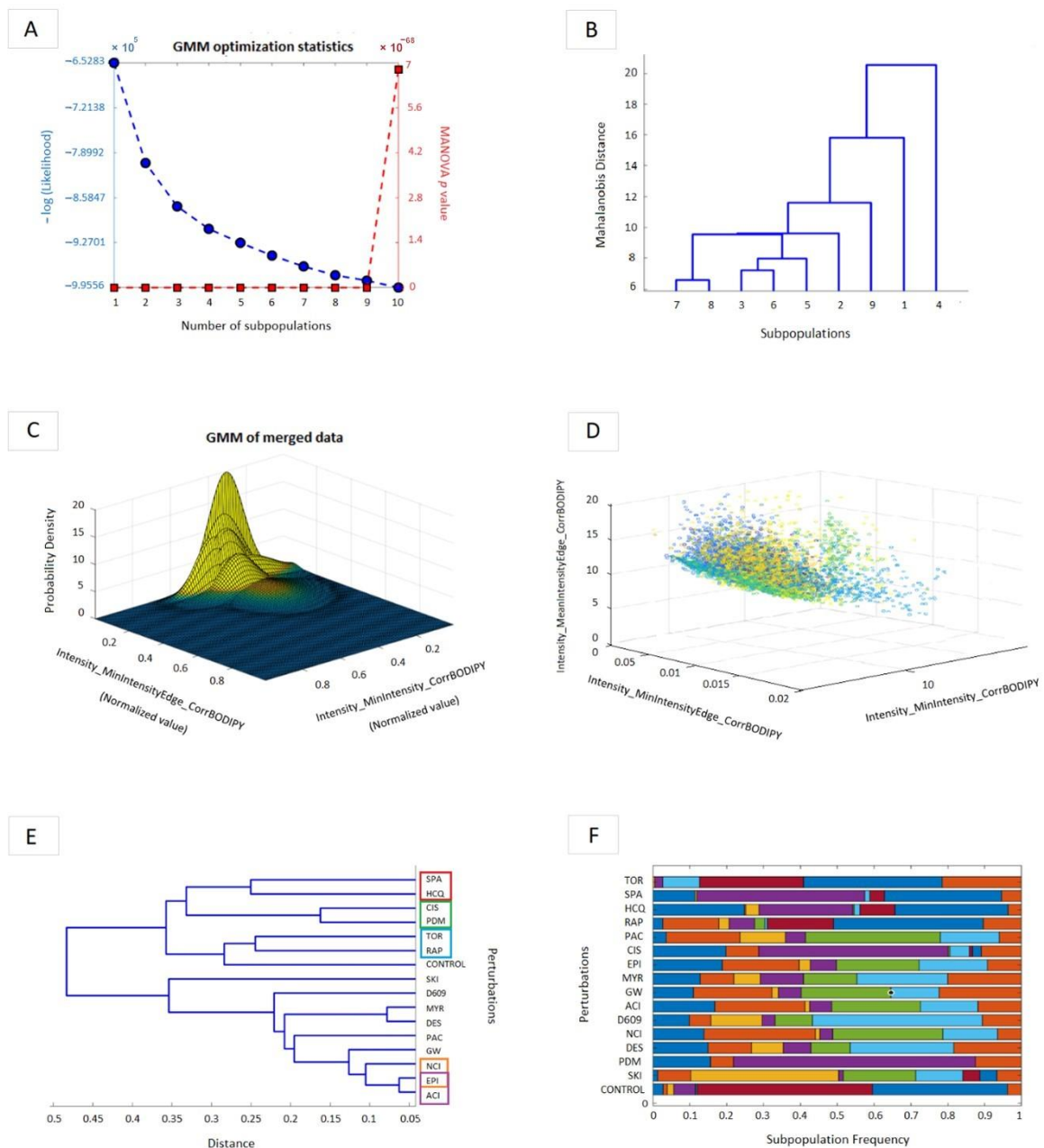


Figura 20. Modelo de mezclas Gaussianas (GMM) permite la asociación de perturbaciones, como potencial explicación de las interacciones sinérgicas reportadas. (A) Optimización estadística de GMM utilizando los parámetros MANOVA (p -value) y $-\text{Log}(\text{likelihood})$. (B) Interacciones de subpoblaciones seleccionadas. (C) Gráfico del GMM para datos combinados. (D) Clasificación de subpoblaciones celulares en un gráfico 3D. (E) Gráfico de dendrograma; los pares encerrados con color son las interacciones de interés. (F) Frecuencia

de subpoblaciones relacionadas con las perturbaciones aplicadas. Los diferentes colores presentados corresponden a diferentes subpoblaciones celulares.

Se propuso una topología de red de la vía de SL para la línea celular de cáncer de pulmón A549 (Figura 21) basada en el metabolismo de la sonda SM-BOD que fue descrita en estudios anteriores (125, 148); los cuadros verdes representan los metabolitos fluorescentes, los blancos indican la pérdida de fluorescencia y los cuadros magenta son las enzimas inhibitoras de la vía de SL (Figura 11, Sección 2.4). Se combinó la topología de la vía de los SL con el modelo del proceso autofágico, destacando los principales pasos de la autofagia con círculos de puntos (P: fagóforo, AP: autofagosoma y AL: autofagolisosoma), en la Figura 21.

De acuerdo con los resultados obtenidos del GMM, se asociaron los pares inhibitor–quimioterapia (obtenidos en la Figura 20) para mapear sus interacciones con la vía de los SL. Los cuadros amarillos representan los fármacos quimioterapéuticos detectados según los grupos identificados en el gráfico del dendrograma (Figura 20E), que fueron EPI – NCI, EPI–ACI y CIS– PDMP. Se asociaron los moduladores de autofagia RAP– TOR y SPA– HCQ (cuadros azules y grises, respectivamente; Figura 21); sin embargo, no fue imposible asignarlos a una perturbación conocida dentro de la vía SL. Estos resultados sugieren que los tratamientos quimioterapéuticos perturban la vía SL de manera similar a sus correspondientes inhibidores conocidos.

La topología del modelo descrito en la Figura 21, sugiere que los mecanismos potenciales de las perturbaciones dobles identificadas presentan efectos sinérgicos en la citotoxicidad. Los pares EPI – ACI y EPI – NCI inhiben potencialmente la síntesis de So y, aumentan la concentración de Cer en diferentes compartimentos celulares. La inhibición de la ceramidasa neutra por el par EPI– NCI aumenta potencialmente el contenido de Cer localizado en la membrana plasmática (CER_PM). Por su parte, la inhibición de la enzima ceramidasa ácida por la interacción EPI– ACI conduce a la acumulación de Cer en el compartimento lisosomal. Además, la interacción de CIS– PDMP inhibe potencialmente la

enzima glucosilceramida sintasa para evitar la síntesis de glucosilceramida (GLU_CER), lo que desencadena un aumento de Cer en el ER y en el lado citosólico del aparato de Golgi.

La topología mostrada (Figura 21) también sugiere que las interacciones de la quimioterapia con los inductores de autofagia TOR o RAP, estimulan la formación de AP para mover material celular (incluidos los SL) desde la membrana plasmática (SM_PM) al compartimento lisosomal (CER_LYS).

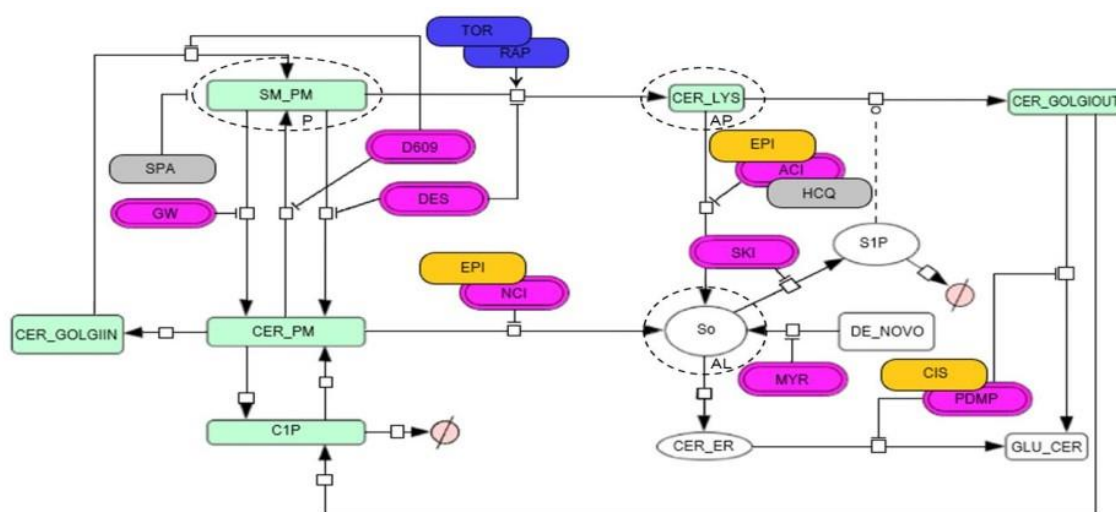


Figura 21. Topología modelo para la línea celular de cáncer de pulmón A549–WT del destino metabólico de un análogo de esfingomielina fluorescente (SM-BOD) en conjunto con el proceso autofágico (círculos punteados). Abreviaturas en la figura: P: fagóforo, AP: autofagosoma; AL: autofagolisosoma. Este modelo, permite inferir cómo los diferentes agentes quimioterapéuticos e inhibidores perturban la vía de los SL.

Como se mencionó anteriormente, el *cluster* de inhibidores de la autofagia SPA-HCQ no se mapeó con ninguna perturbación conocida de la vía de SL. Según el modelo de red propuesto, la SPA inhibe la formación del fagóforo (P) en la PM y, curiosamente, la HCQ muestra un comportamiento similar al ACI, inhibiendo así la enzima ceramidasa ácida, la cual previene potencialmente la formación de autofagolisosomas (AL).

Estos resultados indican que los perfiles de heterogeneidad obtenidos del GMM permiten mapear la influencia de perturbaciones individuales en la vía de los SL. Este mapeo topológico también sugiere las bases mecanicistas de las interacciones sinérgicas entre los fármacos quimioterapéuticos y las perturbaciones conocidas de la vía autofágica y la vía de SL.

5.3 Células estables marcadas con mCherry-EGFP-LC3B y SM-BOD, muestran que las interacciones de EPI con TOR y RAP estimulan la acumulación de autofagosomas.

De acuerdo con la topología propuesta, se planteó la hipótesis de que las interacciones de los fármacos quimioterapéuticos con los inductores de autofagia TOR y RAP conducen a un aumento de vesículas, potencialmente asociadas con la acumulación local de Cer en esos compartimentos (Figura 21). Para confirmar dicha hipótesis, se diseñó una imagen compuesta con los resultados control y los resultados de perturbaciones dobles y simples para las interacciones de EPI– RAP y EPI– TOR en las células estables A549 LC3/m-Cherry (mCherry-EGFP-LC3B) marcadas con SM-BOD (Figura 22), con el fin de visualizar la presencia de AP marcados con fluorescencia (cargados con SL) para las condiciones experimentales planteadas, utilizando microscopía de fluorescencia.

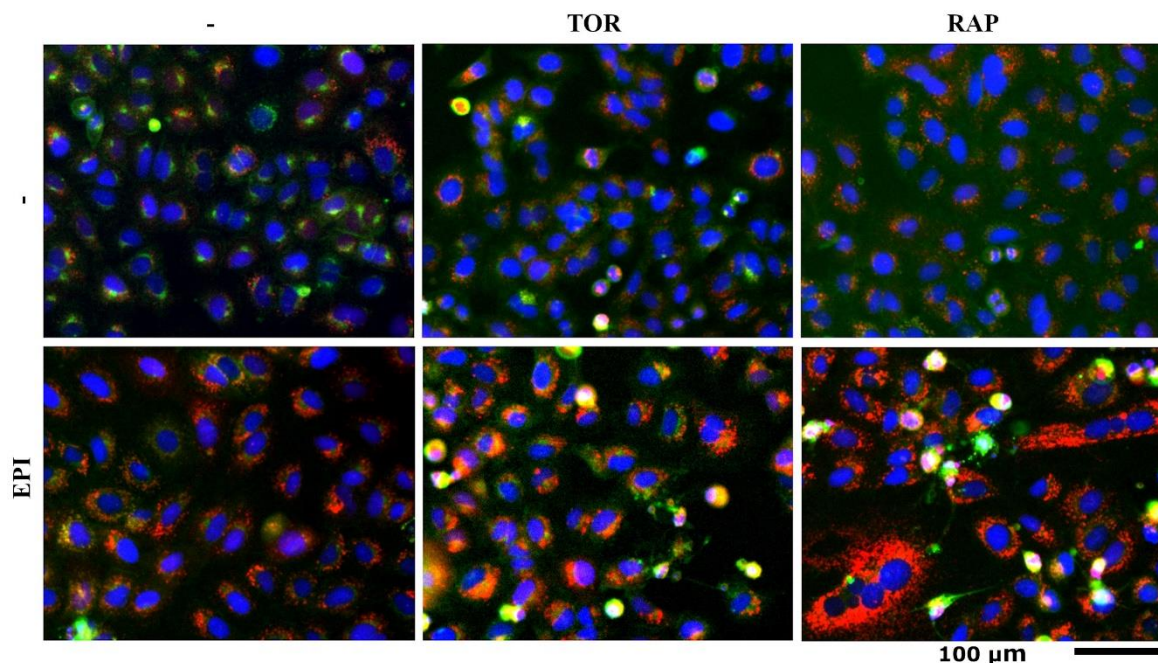


Figura 22. Análisis experimental para evidenciar el proceso autofágico, mediante el incremento en el contenido de autofagosomas (AP) en las condiciones sinérgicas seleccionadas a las 24 h para las células estables A549 mCherry-EGFP-LC3B (A549 LC3/m-Cherry), mediante microscopía de fluorescencia. Imagen compuesta de control, perturbaciones simples de EPI, RAP y TOR, y perturbaciones dobles de EPI-RAP y EPI-TOR. Abreviaturas en la figura: EPI: epirrubicina; RAP: rapamicina; TOR: torin-2. Escala: 100 μm.

La imagen compuesta para las células estables A549 LC3/m-Cherry (Figura 22) muestra un aumento significativo en el patrón vesicular (el patrón de puntos) para ambas condiciones sinérgicas (EPI– RAP y EPI– TOR) en comparación con sus correspondientes perturbaciones individuales y control a las 24 h. Estos resultados revelan un mecanismo potencial de sinergismo por combinación de inductores de autofagia con inhibidores del metabolismo lisosomales de los SL (o quimioterapias con un efecto similar), desencadenado un aumento local de SL en los compartimentos autofagosómicos que inducen la muerte celular.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los SL son componentes estructurales esenciales de las membranas biológicas y son reguladores cruciales de los procesos celulares (149). Algunos SL se comportan como segundos mensajeros involucrados en las decisiones sobre el destino celular, como Cer (implicado en la muerte celular) y S1P (promueve la supervivencia celular) (150). En este estudio, el análisis de viabilidad celular definió las interacciones sinérgicas que potencian o reducen el efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549– WT (Figura 18). El ensayo celular con una sonda fluorescente análoga de SM permitió la segmentación celular mediante imágenes (Figura 19) y la determinación del nivel de quimiosensibilidad en esta línea celular tratada con diferentes perturbaciones de la vía de los SL (Figura 20). Además, se propuso una topología modelo con perturbaciones mapeadas de las sinergias identificadas para sugerir mecanismos potenciales que expliquen el destino metabólico del biosensor fluorescente (Figura 21) en conjunto con el proceso autofágico. Además, las imágenes compuestas de los ensayos experimentales evidencian la perturbación del proceso autofágico para algunas condiciones específicas, donde se observa un aumento de los AP con una colocalización concomitante del SL fluorescente (Figura 22).

El fluoróforo BODIPY tiene varias ventajas para estudiar el metabolismo y el tráfico de lípidos, específicamente en células vivas. Primero, BODIPY tiene una fluorescencia visible y fuerte, y suele ser muy fotoestable (151). En segundo lugar, la estructura de BODIPY se considera poco polar; por lo tanto, la capacidad de anclaje con la bicapa de la membrana celular eucariota es muy eficiente. En tercer lugar, la longitud de onda de emisión de la fluorescencia BODIPY varía de 450 nm (verde) a 650 nm (rojo) con una mayor concentración en las células (122); esta propiedad hace que la distribución de un análogo lipídico marcado con BODIPY particular y sus metabolitos sean dinámicamente visibles, lo que permite una fácil observación y cuantificación en células vivas bajo microscopía de fluorescencia (122, 152).

Adicionalmente, el fluoróforo BODIPY se caracteriza por ser una de las tinciones celulares más útiles debido a su estabilidad química y térmica y a sus propiedades como

sensor fluorescente para interactuar directamente con diferentes proteínas y péptidos (153). De esta manera, se propuso el uso de BODIPY (en su conformación de SM-BOD) para el rastreo del metabolismo celular como una estrategia prometedora para identificar interacciones sinérgicas entre agentes quimioterapéuticos y moduladores de autofagia o inhibidores de la vía de los SL, con el fin de inducir o no la citotoxicidad.

A nivel celular, se propuso monitorear la tinción con SM-BOD para las dos líneas celulares de interés (A549 asociado al carcinoma de pulmón y MCF-7 del carcinoma de mama) mediante un ensayo cinético, para lo cual se esperaba observar pérdida de la fluorescencia del sensor debido al tránsito y metabolismo de la especie, con resolución de célula a célula a lo largo del tiempo (154). El metabolismo del sensor SM-BOD inicia su localización a nivel de la membrana plasmática; a medida que pasa el tiempo, se internaliza hacia el aparato de Golgi, aumentando la señal en la zona perinuclear y la afinidad de la Cer por este orgánulo (mediada por la interconversión de SM a Cer) (155), lo que confirma el potencial de la tinción SM-BOD para rastrear el metabolismo de los SL a nivel celular.

Como se muestra en la Figura 17, el ensayo cinético muestra que la línea celular A549 mostró pérdida de la fluorescencia de la sonda SM-BOD, indicando el metabolismo celular de la molécula; sin embargo, no se observó el mismo patrón para la línea celular MCF-7 marcada con SM-BOD, ya que la fluorescencia de la tinción se mantuvo constante a lo largo del tiempo. Esto pudo deberse a la degradación de la tinción lipídica al momento del ensayo, lo cual dificultó su uso; es por lo anterior que, no fue posible la continuidad de los experimentos con esta línea celular.

En el análisis de viabilidad celular de A549 (Figura 18) se logró el reconocimiento de las principales sinergias entre las interacciones quimioterapia-perturbación (refiriéndose con perturbación al modulador de autofagia o al inhibidor de la vía de los SL) mediante microscopía de fluorescencia. Posteriormente, el protocolo de segmentación de imágenes (Figura 19) permitió evaluar el efecto de las perturbaciones simples y dobles de la vía de los SL para extraer los *features* más relevantes con resolución de una única célula que permiten la aplicación del modelo matemático GMM para predecir el comportamiento desconocido de agentes quimioterapéuticos con inhibidores conocidos de la vía de los SL (Figura 20).

Se estudiaron las interacciones quimioterapia-perturbación basado en tres agentes quimioterapéuticos principales (EPI, RAP y PAC), debido a que, preliminarmente (Anexo 1), fueron los que arrojaron mejores resultados sinérgicos con diferentes inhibidores de la vía de los SL (143, 156).

EPIRUBICINA (EPI)

La quimioterapia EPI es un tipo de antraciclina, considerado un fármaco genotóxico que se intercala en el ADN y se utiliza para tratamientos contra el cáncer (157), incluido el cáncer de pulmón. Este fármaco quimioterapéutico tiene muchos efectos secundarios relacionados con su alta toxicidad y la aparición de clones neoplásicos quimiorresistentes. Curiosamente, la resistencia a las antraciclinas se asocia con un ajuste en el metabolismo de los lípidos y el proceso autofágico (158, 159). Además, el tratamiento con EPI modula la vía metabólica de SL y regula la autofagia de una manera específica al tipo celular (157, 160); reportes anteriores han descrito que las antraciclinas desencadenan el proceso de muerte celular al estimular la producción de Cer (161).

Después de la evaluación de las interacciones postuladas entre diferentes perturbaciones, se identificó que EPI presenta una sinergia importante con TOR y RAP, los cuales son inductores de autofagia (Figura 20). Por lo tanto, el modelo topológico indica que EPI inhibe la formación de So pero aumentan el contenido de Cer (como se muestra en la Figura 21), estimulando la muerte celular. Estudios científicos previos muestran que tanto RAP como TOR estimulan la autofagia al inhibir el complejo proteico mTOR, aumentando así el transporte de materiales celulares (incluidos los SL como SM-BOD) desde la PM hacia el compartimento lisosomal (129). Dicha información, concuerda con los resultados obtenidos, debido al aumento en el patrón vesicular del compartimento autofagosómico para esas condiciones, lo que indica que el proceso autofágico está activo y sugiere la colocalización de SL (potencialmente Cer) en los AP debido a los sinergismos EPI– TOR y EPI– RAP en la línea celular A549 (Figura 21).

La formación autofágica es un proceso muy complejo que incluye moléculas adaptadoras para mediar en la muerte celular y la metástasis tumoral (162). Este proceso describe la iniciación, nucleación, elongación, maduración, fusión y degradación del material

celular colectado (163). Los AP se fusionan con los lisosomas para formar autofagolisosomas, que degradan su contenido (orgánulos y proteínas) para mantener la homeostasis celular y la renovación de los orgánulos. Los mecanismos reguladores de la autofagia son complejos y su vía de señalización ascendente implica principalmente una vía dependiente de mTOR y una vía independiente de mTOR (AMPK, PI3K, Ras-MAPK, p53, PTEN y estrés del ER) (164).

Estudios previos han demostrado que los SL tienen la capacidad de modular el proceso autofágico. Se ha reportado que la exposición de líneas celulares cancerosas a tratamientos quimioterapéuticos aumenta el contenido de Cer (150). De esta forma, la Cer induce la autofagia a través de tres mecanismos: (i) el anclaje directo de los AP a las mitocondrias (165), (ii) la regulación negativa de los transportadores de nutrientes (166) y (iii) la alteración del complejo Beclin-Bcl-2 (un inhibidor de la autofagia) (167, 168). Durante la autofagia, los constituyentes citoplasmáticos (proteínas y orgánulos) son engolfados en un fagóforo de doble membrana; una vez que la doble membrana se fusiona y el AP madura, es transportado por vías de tubulina (microtúbulos) hasta una localización perinuclear, fusionándose con un lisosoma que genera una estructura autolisosomal capaz de degradar su contenido (169). Lo anterior concuerda con el sitio de mapeo del proceso autofágico en la topología del modelo que se muestra en la Figura 21, en la que se observa que la síntesis de Cer acompaña la acumulación de AP. Además, la Figura 22 muestra la colocalización de SL (presumiblemente Cer) a nivel de lisosoma (vesículas), lo que sugiere que el incremento en la formación de AP por los moduladores TOR y RAP y la interrupción de la degradación de AP mediada por EPI conduce a una acumulación local de SL que potencialmente desencadena la muerte celular.

Asimismo, el modelo *in silico* (mostrado en la Figura 21), muestra que la interacción EPI– TOR y EPI– RAP promueve una acumulación de Cer en los AP y, los resultados del análisis experimental (Figura 22) muestran una colocalización importante de SL (potencialmente Cer) en los AP. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar la identidad de los SL que se acumulan dentro de las vesículas en crecimiento bajo condiciones en las que se bloquea la degradación autofagosómica y la degradación a nivel de SL.

Adicionalmente, en la Figura 18 se reportó que EPI tiene interacciones sinérgicas con los inhibidores ACI y NCI y, según el dendrograma (Figura 20E), se muestra que EPI tiene un comportamiento similar al de ACI y NCI. Sin embargo, es conocido que las perturbaciones de ACI podrían provocar cambios patológicos en ausencia de acumulación de Cer, generando cambios en la expresión genética dentro de la vía de los SL (170), por lo tanto, estas interacciones suelen inhibir la formación de So para propiciar la acumulación de Cer en presencia de la quimioterapia EPI (Figura 21).

Como potente SL bioactivo implicado en la regulación de la progresión del cáncer y la proliferación celular, el receptor de S1P participa en el control de la respuesta tumoral a la quimioterapia, mediante la activación de vías clave como Ras/Erk y PI3K/Akt (171, 172). Debido a su papel en la activación de la autofagia, S1P y la expresión de sus receptores también participan en la transactivación de los mecanismos de señalización del factor de crecimiento, lo que podría ser una dirección potencialmente interesante para futuros estudios como un nuevo enfoque de tratamiento.

CISPLATINO (CIS)

CIS o *cis*-diaminodicloroplatino (II) es un fármaco quimioterapéutico muy conocido y ampliamente utilizado para el tratamiento de numerosos cánceres humanos, incluidos los de vejiga, cabeza y cuello, pulmón, ovario y testículo. El mecanismo de acción de CIS se ha relacionado con su capacidad de entrecruzarse con las bases purínicas del ADN, interfiriendo con los mecanismos de reparación del ADN, causando daño a la cadena de ADN y posteriormente, induciendo la apoptosis en las células cancerosas. Además, se ha considerado que las terapias combinadas de CIS con otros medicamentos, superan la resistencia a los medicamentos y reducen la toxicidad (173–175).

Es importante mencionar que CIS ha reportado resistencia a medicamentos y numerosos efectos secundarios no deseados, como problemas renales graves, reacciones alérgicas, disminución de la inmunidad a las infecciones, trastornos gastrointestinales, hemorragia y pérdida de audición, especialmente en pacientes más jóvenes (173). Sin embargo, la sensibilidad al fármaco CIS se puede mejorar mediante la manipulación de enzimas de la vía metabólica de los SL (176).

CIS está implicado en la muerte de las células en vías reguladas por los SL, en las cuales CIS aumenta el contenido de Cer (177). Esta información sustenta los datos mostrados en la Figura 18, en donde sugiere que el fármaco CIS tiene el principal sinergismo con NCI y, en modelo topológico, CIS se mapeó con PDMP (Figura 21), indicando que ambos presentan comportamientos semejantes. La topología de red, muestra que esta interacción aumentaría el contenido de Cer en la región citosólica del aparato de Golgi (CER_GOLGIOUT), evitando la glicosilación y su conversión a So en la PM (65). Según Dupre *et al.* (2017), la administración de PDMP a células de cáncer de pulmón estimula el estrés del ER, la autofagia y la apoptosis como resultado de las acumulaciones de Cer inducidas por PDMP (177), lo cual evidenciaría que la interacción PDMP-CIS sería una sinergia interesante (Figura 20 y Figura 21); sin embargo, no fue evidenciado en los resultados sinérgicos reportados con PDMP (Figura 18).

PACLITAXEL (PAC)

El agente quimioterapéutico PAC o también llamado taxol, es un compuesto diterpenoide tetracíclico que tiene un efecto antimetabólico sobre las células cancerosas y se usa ampliamente para varios tipos de cáncer como el de mama, ovario, pulmón, etc. (178, 179).

El mecanismo principal del taxol es su capacidad para estabilizar y prevenir la despolimerización de los microtúbulos, lo que lleva al arresto del ciclo celular en la fase G2/M y a la muerte celular; sin embargo, este efecto podría depender de las líneas celulares y de la dosis. Además de la regulación de la mitosis, PAC también modula la supervivencia de las células a través de proteínas reguladoras de la apoptosis, la familia Bcl-2 y también otras vías de señalización como JNK/SAPK y la vía NFκB. El taxol activa o inhibe las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas (BAX/BAK) o anti-apoptóticas (Bcl-2/MCL-1) para provocar la muerte celular en las células cancerosas. El calcio almacenado en el ER también podría ser atacado por PAC y liberado para alterar la homeostasis del calcio, lo que complica la supervivencia celular (178).

Los estudios han demostrado que el agente quimioterapéutico PAC aumenta el contenido de Cer y estimula la expresión de SMasas, por lo que PAC promueve la hidrólisis

de la SM (180). En los resultados expuestos, la quimioterapia PAC es capaz de perturbar la vía de los SL; sin embargo, no se pudo asignar a ningún inhibidor conocido (Figura 21), lo que significa que probablemente perturba la vía de los SL de manera diferente a los inhibidores utilizados en este estudio. Es importante considerar que el modelo simplifica una vía más compleja con un número limitado de inhibidores.

RESULTADOS ADICIONALES

Revisiones anteriores indican que SPA inhibe la autofagia y evita la formación de fagóforos (181). Mientras tanto, la HCQ inhibe la autofagia debido a la acidificación lisosomal y bloquea la fusión de AP con lisosomas, desencadenando la acumulación de AP (182). Por el contrario, los datos experimentales muestran que HCQ y SPA se mapearon juntos en el mismo grupo (Figura 20), lo que sugiere que presentan un comportamiento similar para este modelo celular. Una posible explicación para esta discrepancia es que ambas perturbaciones tienen consecuencias similares a nivel del efecto sobre la distribución de SL, aunque tengan efectos diferentes sobre la autofagia, por lo tanto, no fue posible para el algoritmo separarlas y mapearlas correctamente. En consecuencia, la Figura 21 muestra que SPA fue mapeada inhibiendo el fagóforo, y la HCQ fue mapeada junto con ACI porque la inhibición de la acidificación del autofagolisosoma no le permitiría alcanzar el pH óptimo para la correcta activación de las ceramidasaas ácidas; por lo tanto, tendría un papel similar al de este inhibidor (183).

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

La quimioterapia se utiliza comúnmente para tratar el cáncer, pero tiene beneficios de supervivencia limitados debido a su alta toxicidad (184) y la resistencia farmacológica debida al desarrollo neoplásico. Este proyecto de tesis se basó en la caracterización de la heterogeneidad tumoral como una herramienta para mapear los SL en el destino celular y la señalización del estrés.

Con base en los resultados obtenidos de este trabajo, se propone una estrategia para el tratamiento farmacológico combinatorio destinada a aumentar los niveles de SL antitumorales en compartimentos críticos, lo que lleva a interacciones sinérgicas para mejorar los efectos antineoplásicos de la quimioterapia.

El uso de análogos de SL fluorescentes y sensores moleculares de autofagia proporcionó información valiosa sobre las interacciones citotóxicas de diversos agentes quimioterapéuticos, incluidos EPI, CIS y PAC, en combinación con inhibidores de la vía de los SL y moduladores de la autofagia.

Los resultados revelaron una sinergia significativa, particularmente entre la EPI y los inductores de autofagia (RAP y TOR), lo que lleva a una fuerte reducción de la viabilidad celular. El CIS también demostró efectos sinérgicos cuando se combina con un inhibidor de la ceramidasa. Sin embargo, PAC exhibió principalmente efectos antagónicos cuando se usó en combinación con estos moduladores de autofagia.

El modelo sinérgico proporcionó información crítica sobre la influencia de la quimioterapia en la vía de los SL, lo que sugiere que la combinación de quimioterapias con inductores de autofagia aumenta la formación de vesículas, potencialmente relacionadas con la acumulación de Cer, desencadenantes de la muerte celular.

A través de un análisis del metabolismo de los SL y el flujo autofágico en el contexto de interacciones quimioterapéuticas y utilizando un modelo de cáncer de pulmón A549, los

resultados mostrados establecen la base para el diseño de nuevos protocolos terapéuticos con potenciales aplicaciones clínicas, con el objetivo de mejorar la quimiosensibilidad en tumores heterogéneos y así potenciar la eficiencia y eficacia de los tratamientos contra el cáncer.

7.2 Recomendaciones

Algunas consideraciones que podrían tomarse en cuenta para posteriores estudios en esta línea de investigación incluyen los ensayos cuantitativos de los AP asociados al metabolismo de SL y a la autofagia, dado que estas cuantificaciones no fueron parte del alcance de este proyecto.

Asimismo, se podría sugerir estudios que permitan determinar la identidad de los SL que se acumulan dentro de los AP en crecimiento, bajo condiciones en las que se bloquea la degradación autofagosómica y la degradación a nivel de SL. Esto permitiría comprobar la hipótesis de que potencialmente la Cer es el SL presente en este proceso, lo cual justificaría la muerte celular ante las sinergias de EPI con los moduladores de autofagia RAP y TOR.

Por otra parte, considerando las limitaciones del uso de un fluoróforo de gran tamaño como BODIPY, con gran impedimento estérico en su estructura, se podría sugerir el uso de SL bifuncionales (SL- Bif), los cuales presentan un fluoróforo químicamente acoplado (mediante una reacción denominada *click reaction* (Anexo 4), más pequeño y con una mayor similitud al SL celular endógeno (185), lo cual permite rastrear de manera más directa el comportamiento dinámico de las especies de la vía de los SL sin la interferencia que generan los fluoróforos voluminoso en la señalización celular (126). Pese a que se hicieron todos los esfuerzos por aplicar las técnicas bifuncionales como parte de este trabajo, no fue posible debido a limitaciones de reactivos y tiempos de entrega.

Finalmente, se podría sugerir el uso de herramientas como el microscopio NanoLive (<https://www.nanolive.ch/>), el cual permite un análisis ilimitado de células vivas e inclusive en 3D, sin necesidad de añadir fluoróforos, de manera que se pueden tomar imágenes en el tiempo o en un momento específico, lo cual facilita el estudio del comportamiento celular ante perturbaciones desde su conformación endógena.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernandis AZ, Wenk MR. 2009. Lipid-based biomarkers for cancer. *J Chromatogr B* 877:2830–2835.
2. Kitano H. 2004. Cancer as a robust system: Implications for anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:227–235.
3. Singh DK, Ku CJ, Wichaidit C, Steininger RJ, Wu LF, Altschuler SJ. 2010. Patterns of basal signaling heterogeneity can distinguish cellular populations with different drug sensitivities. *Mol Syst Biol* 6:1–10.
4. Slack MD, Martinez ED, Wu LF, Altschuler SJ. 2008. Characterizing heterogeneous cellular responses to perturbations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19306–19311.
5. Kitano H. 2007. A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov* 6:202–210.
6. Ogretmen B. 2006. Sphingolipids in cancer: Regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Lett* 580:5467–5476.
7. Newton J, Lima S, Maceyka M, Spiegel S, Jason Newton, Santiago Lima, Michael Maceyka SS. 2015. Revisiting the sphingolipid rheostat: evolving concepts in cancer therapy. Elsevier Inc 333:195–200.
8. Humaira Khan, Muhammad Raza Shah, Jiri Barek MIM. 2023. Cancer biomarkers and their biosensors: A comprehensive review. *TrAC Trends Anal Chem* 158.
9. Luo G, Liu N. 2019. An integrative theory for cancer (Review). *Int J Mol Med* 43:647–656.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the National Cancer Institute (NCI). 2023. Cancer Statistics At a Glance. https://gis.cdc.gov/Cancer/USCS/?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.g

ov%2Fcancer%2Fdataviz%2Findex.htm#/AtAGlance/.

11. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Viñals F, Capellá G. 2010. Recent advances in cancer therapy: An Overview. *Curr Pharm Des* 16:3–10.
12. Cooper G. 2010. *The Cell: A molecular approach*, 5th ed.
13. Yamamoto Y, Kasashima H, Fukui Y, Tsujio G, Yashiro M, Maeda K. 2023. The heterogeneity of cancer-associated fibroblast subpopulations: Their origins, biomarkers, and roles in the tumor microenvironment. *Cancer Sci* 114:16–24.
14. Dagogo-Jack I, Shaw AT. 2018. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 15:81–94.
15. Yabo YA, Niclou SP, Golebiewska A. 2022. Erratum: Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma (*Neuro-Oncology* (2022) 24:5 (669-682) DOI: 10.1093/neuonc/noab269). *Neuro Oncol* 24:2011.
16. Lodish H, Berk A, Zipursky SL. 2000. *Molecular Cell Biology*, p. . In W. H. Freeman (ed.), 4th Editio. New York.
17. Knizhnik A V., Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M, Kaina B. 2013. Survival and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage. *PLoS One* 8:1–12.
18. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. 2024. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* 74:12–49.
19. Organization PAHOWH. 2024. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. <https://www.paho.org/en/news/1-2-2024-global-cancer-burden-growing-amidst-mounting-need-services>.
20. International Agency for Research Cancer WHO. 2024. Cancer over time. <https://gco.iarc.fr/en>.

21. American Cancer Society. 2023. 2023-Cancer-Facts-and-Figures.
22. Scott J Adams, Emily Stone, David R Baldwin, Rozemarijn Vliegthart, Pyng Lee FJF. 2023. Lung Cancer Screening. *Lancet* 401:390–408.
23. Lung Cancer Research Foundation. 2023. Lung Cancer Facts 2023. <https://www.lungcancerresearchfoundation.org/lung-cancer-facts/>.
24. Prevention USC for DC and. 2023. Lung Cancer Among People Who Never Smoked. https://www.cdc.gov/lung-cancer/nonsmokers/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/cancer/lung/nonsmokers/.
25. National Breast Cancer Foundation I. 2024. Types of Breast Cancer. <https://www.nationalbreastcancer.org/dcis/>.
26. Organization WH. 2024. Breast Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer#:~:text=Roughly half of all breast,breast cancers occur in men.>
27. National Cancer Institute (NIH). 2023. Breast Cancer Screening. <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-screening-pdq>.
28. Breast Cancer Organization. 2024. Breast Cancer Facts and Statistics. <https://www.breastcancer.org/facts-statistics>.
29. Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2014. Essential cell biology, p. 359–379. *In* Essential cell biology, 4th, Editi ed. Garland Science.
30. Lee M, Lee SY, Bae YS. 2023. Functional roles of sphingolipids in immunity and their implication in disease. *Exp Mol Med* 55:1110–1130.
31. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2007. Molecular Biology of the CellMolecular Biology of the Cell.

32. Watson H. 2015. Biological membranes. *Essays Biochem* 59:43–70.
33. Hannun YA, Obeid LM. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139–150.
34. Gautier A, Hinner MJ. 2015. Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols. *Site-Specific Protein Labeling Methods Protoc* 1–267.
35. Merrill AH. 2011. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev* 111:6387–6422.
36. Luo J, Yang H, Song BL. 2020. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:225–245.
37. Funato K, Riezman H, Muñoz M. 2020. Vesicular and non-vesicular lipid export from the ER to the secretory pathway. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1865:158453.
38. Cooper GM, Hausman RE. 2011. *La Célula*.
39. Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.
40. Mercer J, Helenius A. 2009. Virus entry by macropinocytosis (Review) 11.
41. Mayor S, Pagano RE. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:603–612.
42. Dadsena S, Bockelmann S, Mina JGM, Hassan DG, Korneev S, Razzera G, Jahn H, Niekamp P, Müller D, Schneider M, Tafesse FG, Marrink SJ, Melo MN, Holthuis JCM. 2019. Ceramides bind VDAC2 to trigger mitochondrial apoptosis. *Nat Commun* 10.
43. Gault, CR; Obeid, LM; Hannun Y. 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol* 688:1–23.

44. Futerman AH, Hannun YA. 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 5:777–782.
45. Hannun YA, Luberto C. 2004. Lipid metabolism: Ceramide transfer protein adds a new dimension. *Curr Biol* 14:163–165.
46. Venkataraman K, Futerman AH. 2000. Ceramide as a second messenger: Sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol* 10:408–412.
47. Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardaill D. 2004. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J* 382:527–533.
48. Hannun YA, Obeid LM. 2018. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:175–191.
49. MacEyka M, Spiegel S. 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510:58–67.
50. Milhas D, Clarke CJ, Hannun YA. 2010. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett* 584:1887–1894.
51. Bornancin F. 2011. Ceramide kinase: The first decade. *Cell Signal* 23:999–1008.
52. Diaz Escarcega R, McCullough LD, Tsvetkov AS. 2021. The Functional Role of Sphingosine Kinase 2. *Front Mol Biosci* 8:1–7.
53. Hait NC, Maiti A. 2017. The Role of Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide-1-Phosphate in Inflammation and Cancer. *Mediators Inflamm* 2017.
54. Gómez-Muñoz A, Kong JY, Salh B, Steinbrecher UP. 2004. Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J Lipid Res* 45:99–105.
55. Granado MH, Gangoiti P, Ouro A, Arana L, Gómez-Muñoz A. 2009. Ceramide 1-phosphate inhibits serine palmitoyltransferase and blocks apoptosis in alveolar

- macrophages. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1791:263–272.
56. Van Meeteren LA, Ruurs P, Christodoulou E, Goding JW, Takakusa H, Kikuchi K, Perrakis A, Nagano T, Moolenaar WH. 2005. Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 280:21155–21161.
 57. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. 2008. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal* 20:1010–1018.
 58. Kitatani K, Akiba S, Hayama M, Sato T. 2001. Ceramide accelerates dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 to decrease prostaglandin D2 production in RBL-2H3 cells. *Arch Biochem Biophys* 395:208–214.
 59. Menaldino DS, Bushnev A, Sun A, Liotta DC, Symolon H, Desai K, Dillehay DL, Peng Q, Wang E, Allegood J, Trotman-Pruett S, Sullards MC, Merrill AH. 2003. Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: Enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Res* 47:373–381.
 60. Delgado A, Casas J, Llebaria A, Abad JL, Fabriás G. 2007. Chemical tools to investigate sphingolipid metabolism and functions. *ChemMedChem* 2:580–606.
 61. Quinville BM, Deschenes NM, Ryckman AE, Walia JS. 2021. A comprehensive review: Sphingolipid metabolism and implications of disruption in sphingolipid homeostasis. *Int J Mol Sci* 22.
 62. Kroll A, Cho HE, Kang MH. 2020. Antineoplastic Agents Targeting Sphingolipid Pathways. *Front Oncol*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00833>.
 63. Pralhada Rao R, Vaidyanathan N, Rengasamy M, Mammen Oommen A, Somaiya N, Jagannath MR. 2013. Sphingolipid Metabolic Pathway: An Overview of Major Roles Played in Human Diseases. *J Lipids* 2013:1–12.
 64. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L, Russo D. 2013. Glycosphingolipids: Synthesis and functions. *FEBS J* 280:6338–6353.

65. Molina-Mora JA, Kop-Montero M, Quirós-Fernández I, Quiros S, Crespo-Mariño JL, Mora-Rodríguez RA. 2018. A hybrid mathematical modeling approach of the metabolic fate of a fluorescent sphingolipid analogue to predict cancer chemosensitivity. *Comput Biol Med* 97:8–20.
66. Shaw J, Costa-Pinheiro P, Patterson L, Drews K, Spiegel S, Kester M. 2018. Novel Sphingolipid-Based Cancer Therapeutics in the Personalized Medicine Era. *Adv Cancer Res* 140:327–366.
67. Figuera-Losada M, Stathis M, Dorskind JM, Thomas AG, Bandaru VVR, Yoo S-W, Westwood NJ, Rogers GW, McArthur JC, Haughey NJ, Slusher BS, Rojas C. 2015. Cambinol, a Novel Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase 2 Shows Neuroprotective Properties. *PLoS One* 10:e0124481.
68. Xiang H, Jin S, Tan F, Xu Y, Lu Y, Wu T. 2021. Physiological functions and therapeutic applications of neutral sphingomyelinase and acid sphingomyelinase. *Biomed Pharmacother* 139:111610.
69. Bhat AH, Dar KB, Khan A, Alshahrani S, Alshehri SM, Ghoneim MM, Alam P, Shakeel F. 2022. Tricyclodecan-9-yl-Xanthogenate (D609): Mechanism of Action and Pharmacological Applications. *Int J Mol Sci* 23:3305.
70. D'Angelo G, Moorthi S, Luberto C. 2018. Role and Function of Sphingomyelin Biosynthesis in the Development of Cancer, p. 61–96. *In* .
71. Taniguchi M, 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.
72. He X, Schuchman EH. 2023. Identification of a Novel Acid Sphingomyelinase Activity Associated with Recombinant Human Acid Ceramidase. *Biomolecules* 13:1623.
73. Riess JW, Jahchan NS, Das M, Zach Koontz M, Kunz PL, Wakelee HA, Schatzberg A, Sage J, Neal JW. 2020. A PHASE IIA STUDY REPOSITIONING

DESIPRAMINE IN SMALL CELL LUNG CANCER AND OTHER HIGH-GRADE NEUROENDOCRINE TUMORS. *Cancer Treat Res Commun* 23:100174.

74. Elojeimy S, Holman DH, Liu X, El-Zawahry A, Villani M, Cheng JC, Mahdy A, Zeidan Y, Bielwaska A, Hannun YA, Norris JS. 2006. New insights on the use of desipramine as an inhibitor for acid ceramidase. *FEBS Lett* 580:4751–4756.
75. Kabolizadeh P, Engelmann BJ, Pullen N, Stewart JK, Ryan JJ, Farrell NP. 2012. Platinum anticancer agents and antidepressants: desipramine enhances platinum-based cytotoxicity in human colon cancer cells. *JBIC J Biol Inorg Chem* 17:123–132.
76. M. Barth B, C. Cabot M, Kester M. 2011. Ceramide-Based Therapeutics for the Treatment of Cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 11:911–919.
77. Pastukhov O, Schwalm S, Zangemeister-Wittke U, Fabbro D, Bornancin F, Japtok L, Kleuser B, Pfeilschifter J, Huwiler A. 2014. The ceramide kinase inhibitor NVP-231 inhibits breast and lung cancer cell proliferation by inducing M phase arrest and subsequent cell death. *Br J Pharmacol* 171:5829–5844.
78. Wajapeyee N, Beamon TC, Gupta R. 2024. Roles and therapeutic targeting of ceramide metabolism in cancer. *Mol Metab* 83:101936.
79. Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. 2004. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* 206:169–180.
80. Coant N, Sakamoto W, Mao C, Hannun YA. 2017. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv Biol Regul* 63:122–131.
81. Xu R, Antwi Boasiako P, Mao C. 2021. Alkaline ceramidase family: The first two decades. *Cell Signal* 78:109860.
82. Canals D, Perry DM, Jenkins RW, Hannun YA. 2011. Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *Br J Pharmacol* 163:694–712.
83. García-Barros M, Coant N, Kawamori T, Wada M, Snider AJ, Truman J, Wu BX,

- Furuya H, Clarke CJ, Bialkowska AB, Ghaleb A, Yang VW, Obeid LM, Hannun YA. 2016. Role of neutral ceramidase in colon cancer. *FASEB J* 30:4159–4171.
84. Cho SM, Kwon HJ. 2019. Acid ceramidase, an emerging target for anti-cancer and anti-angiogenesis. *Arch Pharm Res* 42:232–243.
85. Bai A, Mao C, Jenkins RW, Szulc ZM, Bielawska A, Hannun YA. 2017. Anticancer actions of lysosomally targeted inhibitor, LCL521, of acid ceramidase. *PLoS One* 12:e0177805.
86. Dementiev A, Joachimiak A, Nguyen H, Gorelik A, Illes K, Shabani S, Gelsomino M, Ahn E-YE, Nagar B, Doan N. 2019. Molecular Mechanism of Inhibition of Acid Ceramidase by Carmofur. *J Med Chem* 62:987–992.
87. Islam MM, Mirza SP. 2022. Versatile use of Carmofur: A comprehensive review of its chemistry and pharmacology. *Drug Dev Res* 83:1505–1518.
88. Gupta P, Taiyab A, Hussain A, Alajmi MF, Islam A, Hassan MI. 2021. Targeting the sphingosine kinase/sphingosine-1-phosphate signaling axis in drug discovery for cancer therapy. *Cancers (Basel)* 13:1–30.
89. Kummetha Venkata J, An N, Stuart R, Costa LJ, Cai H, Coker W, Song JH, Gibbs K, Matson T, Garrett-Mayer E, Wan Z, Ogretmen B, Smith C, Kang Y. 2014. Inhibition of sphingosine kinase 2 downregulates the expression of c-Myc and Mcl-1 and induces apoptosis in multiple myeloma. *Blood* 124:1915–1925.
90. Maines LW, Keller SN, Smith CD. 2023. Opaganib (ABC294640) Induces Immunogenic Tumor Cell Death and Enhances Checkpoint Antibody Therapy. *Int J Mol Sci* 24.
91. Yi X, Tang X, Li T, Chen L, He H, Wu X, Xiang C, Cao M, Wang Z, Wang Y, Wang Y, Huang X. 2023. Therapeutic potential of the sphingosine kinase 1 inhibitor, PF-543. *Biomed Pharmacother* 163:114401.
92. Schiffmann S, Hartmann D, Fuchs S, Birod K, Ferreiròs N, Schreiber Y, Zivkovic A,

- Geisslinger G, Grösch S, Stark H. 2012. Inhibitors of specific ceramide synthases. *Biochimie* 94:558–565.
93. Alizadeh J, da Silva Rosa SC, Weng X, Jacobs J, Lorzadeh S, Ravandi A, Vitorino R, Pecic S, Zivkovic A, Stark H, Shojaei S, Ghavami S. 2023. Ceramides and ceramide synthases in cancer: Focus on apoptosis and autophagy. *Eur J Cell Biol* 102:151337.
94. Adachi R, Asano Y, Ogawa K, Oonishi M, Tanaka Y, Kawamoto T. 2018. Pharmacological characterization of synthetic serine palmitoyltransferase inhibitors by biochemical and cellular analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 497:1171–1176.
95. Lee Y-S, Choi K-M, Lee S, Sin D-M, Yoo K-S, Lim Y, Lee Y-M, Hong J-T, Yun Y-P, Yoo H-S. 2012. Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, suppresses tumor growth in a murine melanoma model by inhibiting de novo sphingolipid synthesis. *Cancer Biol Ther* 13:92–100.
96. McEachern KA, Fung J, Komarnitsky S, Siegel CS, Chuang W-L, Hutto E, Shayman JA, Grabowski GA, Aerts JMFG, Cheng SH, Copeland DP, Marshall J. 2007. A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 91:259–267.
97. Huang W, Tsai C, Chen C, Chen T, Chen Y, Lin Y, Lu P, Lin C, Wang S, Tsao C, Wang C, Cheng Y, Hsieh C, Tseng P, Lin C. 2011. Glucosylceramide synthase inhibitor PDMP sensitizes chronic myeloid leukemia T315I mutant to Bcr-Abl inhibitor and cooperatively induces glycogen synthase kinase-3-regulated apoptosis. *FASEB J* 25:3661–3673.
98. Mistry PK, Lukina E, Ben Turkia H, Amato D, Baris H, Dasouki M, Ghosn M, Mehta A, Packman S, Pastores G, Petakov M, Assouline S, Balwani M, Danda S, Hadjiev E, Ortega A, Shankar S, Solano MH, Ross L, Angell J, Peterschmitt MJ. 2015. Effect of Oral Eliglustat on Splenomegaly in Patients With Gaucher Disease Type 1. *JAMA* 313:695.

99. Gansevoort RT, Hariri A, Minini P, Ahn C, Chapman AB, Horie S, Knebelmann B, Mrug M, Ong ACM, Pei YPC, Torres VE, Modur V, Antonshchuk I, Perrone RD. 2023. Venglustat, a Novel Glucosylceramide Synthase Inhibitor, in Patients at Risk of Rapidly Progressing ADPKD: Primary Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2/3 Randomized Clinical Trial. *Am J Kidney Dis* 81:517-527.e1.
100. Hartwig P, Höglinger D. 2021. The Glucosylceramide Synthase Inhibitor PDMP Causes Lysosomal Lipid Accumulation and mTOR Inactivation. *Int J Mol Sci* 22:7065.
101. Gouaze-Andersson V, Cabot MC. 2006. Glycosphingolipids and drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1758:2096–2103.
102. Tirodkar TS, Voelkel-Johnson C. 2012. Sphingolipids in apoptosis. *Exp Oncol* 34:231–242.
103. Molina-Mora JA, Mora-Rodriguez RA. 2016. Identification of cancer chemosensitivity by ODE and GMM modeling of heterogeneous cellular response to perturbations in fluorescent sphingolipid metabolism. 2016, IEEE 36th Cent Am Panama Conv CONCAPAN 2016 <https://doi.org/10.1109/CONCAPAN.2016.7942347>.
104. Mullen TD, Obeid LM. 2012. Ceramide and Apoptosis: Exploring the Enigmatic Connections between Sphingolipid Metabolism and Programmed Cell Death. *Anticancer Agents Med Chem* 12:340–363.
105. Wang J, Chen YL, Li YK, Chen DK, He JF, Yao N. 2021. Functions of Sphingolipids in Pathogenesis During Host–Pathogen Interactions. *Front Microbiol* 12.
106. Brown EM, Ke X, Hitchcock D, Jeanfavre S, Avila-Pacheco J, Nakata T, Arthur TD, Fornelos N, Heim C, Franzosa EA, Watson N, Huttenhower C, Haiser HJ, Dillow G, Graham DB, Finlay BB, Kostic AD, Porter JA, Vlamakis H, Clish CB, Xavier RJ. 2019. Bacteroides-Derived Sphingolipids Are Critical for Maintaining Intestinal Homeostasis and Symbiosis. *Cell Host Microbe* 25:668-680.e7.

107. Johnson EL, Heaver SL, Waters JL, Kim BI, Bretin A, Goodman AL, Gewirtz AT, Worgall TS, Ley RE. 2020. Sphingolipids produced by gut bacteria enter host metabolic pathways impacting ceramide levels. *Nat Commun* 11:1–11.
108. Altschuler SJ, Wu LF. 2010. Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference? *Cell* 141:559–563.
109. Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M, Merrill AH. 2006. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1758:1864–1884.
110. Huwiler A, Pfeilschifter J. 2006. Altering the Sphingosine-1-Phosphate/Ceramide Balance: A Promising Approach for Tumor Therapy. *Curr Pharm Des* 12:4625–4635.
111. Perdomo-Díaz J. 2011. Módulo de enseñanza para la introducción de las ecuaciones diferenciales ordinarias en un ambiente de resolución de problemas con tecnología. *Números Rev Didáctica las Matemáticas* 78:113–134.
112. Nunes J, Naymark M, Sauer L, Muhammad A, Keun H, Sturge J, Stebbing J, Waxman J, Pchejetski D. 2012. Circulating sphingosine-1-phosphate and erythrocyte sphingosine kinase-1 activity as novel biomarkers for early prostate cancer detection. *Br J Cancer* 106:909–915.
113. Mora-Rodriguez RA, Molina-Mora JA. 2017. Characterization of heterogeneous response to chemotherapy by perturbation-based modeling of fluorescent sphingolipid metabolism in cancer cell subpopulations. 2016 IEEE 36th Cent Am Panama Conv CONCAPAN 2016 <https://doi.org/10.1109/CONCAPAN.2016.7942346>.
114. Di Bartolomeo S, Spinedi A. 2001. Differential chemosensitizing effect of two glucosylceramide synthase inhibitors in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288:269–274.
115. Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. 2001. Targeting ceramide metabolism - A

- strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst* 93:347–357.
116. Radin NS. 2004. Poly-drug cancer therapy based on ceramide. *Exp Oncol* 26:3–10.
 117. Radin NS. 2001. Killing cancer cells by poly-drug elevation of ceramide levels: A hypothesis whose time has come? *Eur J Biochem* 268:193–204.
 118. Millner A, Atilla-Gokcumen GE. 2021. Solving the enigma: Mass spectrometry and small molecule probes to study sphingolipid function. *Curr Opin Chem Biol* 65:49–56.
 119. Chen J, Devaraj N. 2021. Synthetic probes and chemical tools in sphingolipid research. *Curr Opin Chem Biol* 65:126–135.
 120. Mohamed ZH, Rhein C, Saied EM, Kornhuber J, Arenz C. 2018. FRET probes for measuring sphingolipid metabolizing enzyme activity. *Chem Phys Lipids* 216:152–161.
 121. Lipsky NG, Pagano RE. 1983. Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: Microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2608–2612.
 122. Pagano RE, Martin OC, Kang HC, Haugland RP. 1991. A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: Accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. *J Cell Biol* 113:1267–1279.
 123. Schwarzmann G, Arenz C, Sandhoff K. 2014. Labeled chemical biology tools for investigating sphingolipid metabolism, trafficking and interaction with lipids and proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1841:1161–1173.
 124. Kim R, Lou K, Kraft ML. 2013. A new, long-wavelength borondipyrromethene sphingosine for studying sphingolipid dynamics in live cells. *J Lipid Res* 54:265–275.
 125. Quiros-Fernandez I, Molina-Mora J, Kop-Montero M, Salas-Hidalgo E, Mora-

- Rodriguez R. 2018. Predicting Cancer Chemosensitivity Based on Intensity/Distribution Profiles of Cells Loaded with a Fluorescent Sphingolipid Analogue, p. 1–8. *In* 2018 IEEE International Work Conference on Bioinspired Intelligence (IWOBI). IEEE.
126. Kuerschner L, Ejsing CS, Ekroos K, Shevchenko A, Anderson KI, Thiele C. 2005. Polyene-lipids: A new tool to image lipids. *Nat Methods* 2:39–45.
127. Fischer T. BODIPYTM FL C5-Sphingomyelin. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D3522>.
128. Fink J, Seibel J. 2018. Click reactions with functional sphingolipids. *Biol Chem* 399:1157–1168.
129. Harvald EB, Olsen ASB, Færgeman NJ. 2015. Autophagy in the light of sphingolipid metabolism. *Apoptosis* 20:658–670.
130. Bedia, Carmen; Levade, Thierry, Codogno P. 2011. Regulation of Autophagy by Sphingolipids 858:1–10.
131. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval I V., Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5:539–545.
132. Varela YR, Iriando MN, Goñi FM, Alonso A, Montes LR. 2024. Ceramide regulation of autophagy: A biophysical approach. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1869.
133. Noda NN, Inagaki F. 2015. Mechanisms of Autophagy. *Annu Rev Biophys* 44:101–122.
134. Ktistakis NT, Tooze SA. 2016. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends Cell Biol* 26:624–635.
135. Melia TJ, Lystad AH, Simonsen A. 2020. Autophagosome biogenesis: From

- membrane growth to closure. *J Cell Biol* 219:1–18.
136. Hansen TE, Johansen T. 2011. Following autophagy step by step. *BMC Biol* 9:2–5.
 137. Hundeshagen P, Hamacher-Brady A, Eils R, Brady NR. 2011. Concurrent detection of autolysosome formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. *BMC Biol* 9:1–15.
 138. Johansen T, Lamark T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7:279–296.
 139. Quiros-Fernandez I, Figueroa-Protti L, Arias-Arias JL, Brenes-Cordero N, Siles F, Mora J, Mora-Rodríguez RA. 2021. Perturbation-based modeling unveils the autophagic modulation of chemosensitivity and immunogenicity in breast cancer cells. *Metabolites* 11.
 140. Ministerio de Salud de Costa Rica. 2024. Registro Nacional de Tumores. INEC Present INFOGRAFÍA Espec DEL DÍA Mund CONTRA EL CÁNCER. <https://inec.cr/noticias/inec-presenta-infografia-especial-del-dia-mundial-contra-el-cancer>.
 141. Modrak DE. 2005. Measurement of ceramide and sphingolipid metabolism in tumors: potential modulation of chemotherapy. *Methods Mol Med* 111:183–194.
 142. Mesén-Porras S, Rojas-Céspedes A, Molina-Mora JA, Vega-Baudrit J, Siles F, Quiros S, Mora-Rodríguez R. 2023. Sphingolipid-Based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells. *Cells* 12.
 143. Rojas Céspedes A. 2020. Evaluación del Potencial de un sensor fluorescente análogo a esfingomielina para identificar interacciones quimioterapéuticas en un modelo celular de cáncer de pulmón. Universidad de Costa Rica.
 144. Muñoz-Cuevas JH. 2011. Sinergia y adición en anestesiología. *Rev Mex Anesthesiol* 34:195–199.

145. Mora R, Dokic I, Kees T, Hüber CM, Keitel D, Geibig R, Brügge B, Zentgraf H, Brady NR, Régnier-Vigouroux A. 2010. Sphingolipid rheostat alterations related to transformation can be exploited for specific induction of lysosomal cell death in murine and human glioma. *Glia* 58:1364–1383.
146. N'Diaye EN, Kajihara KK, Hsieh I, Morisaki H, Debnath J, Brown EJ. 2009. PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. *EMBO Rep* 10:173–179.
147. Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM. 1996. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* 70:5701–5705.
148. Molina-Mora JA, Mesen-Porras S, Quiros-Fernandez I, Kop-Montero M, Rojas-Céspedes A, Quiros S, Siles F, Mora R. 2022. Sphingolipid pathway as a biosensor of cancer chemosensitivity : a proof of principle. *Uniciencia* 36:1–15.
149. Haberkant P, Stein F, Höglinger D, Gerl MJ, Brügger B, Van Veldhoven PP, Krijgsveld J, Gavin AC, Schultz C. 2016. Bifunctional Sphingosine for Cell-Based Analysis of Protein-Sphingolipid Interactions. *ACS Chem Biol* 11:222–230.
150. Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Levade T, Ghidoni R, Botti J, Codogno P. 2007. Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision? *Autophagy* 3:45–47.
151. Johnson ID, Kang HC, Haugland RP. 1991. Fluorescent membrane probes incorporating dipyrrometheneboron difluoride fluorophores. *Anal Biochem* 198:228–237.
152. Wei Fan and Xiaoling Li. 2022. Using BODIPY FL-Sphingolipid Analogs to Study Sphingolipid Metabolism in Mouse Embryonic Stem Cells. *Bio-Protocol* 12.
153. Jameson LP, Smith NW, Annunziata O, Dzyuba S V. 2016. Interaction of BODIPY dyes with bovine serum albumin: A case study on the aggregation of a click-BODIPY dye. *Phys Chem Chem Phys* 18:14182–14185.

154. José Arturo Molina Mora. 2015. Modelado matemático híbrido de la vía de esfingolípidos usando sensores fluorescentes para modular la respuesta a la quimioterapia en la línea celular leucémica CCRF-CEM.
155. Koivusalo M, Jansen M, Somerharju P, Ikonen E. 2007. Endocytic Trafficking of Sphingomyelin Depends on Its Acyl Chain Length. *Mol Biol Cell* 18:3250–3263.
156. Quirós Fernández I. 2016. Evaluación de un sensor fluorescente análogo de esfingolípido como predictor de resistencia o sensibilidad a la quimioterapia en un modelo de cáncer de mama. Universidad de Costa Rica.
157. Weigel C, Hüttner SS, Ludwig K, Krieg N, Hofmann S, Schröder NH, Robbe L, Kluge S, Nierhaus A, Winkler MS, Rubio I, von Maltzahn J, Spiegel S, Gräler MH. 2020. S1P lyase inhibition protects against sepsis by promoting disease tolerance via the S1P/S1PR3 axis. *EBioMedicine* 58.
158. Sala V, Della Sala A, Hirsch E, Ghigo A. 2020. Signaling Pathways Underlying Anthracycline Cardiotoxicity. *Antioxidants and Redox Signaling*.
159. Russo M, Della Sala A, Tocchetti CG, Porporato PE, Ghigo A. 2021. Metabolic Aspects of Anthracycline Cardiotoxicity. *Curr Treat Options Oncol* 22.
160. Blaho VA. 2020. Sphingosine 1-phosphate escapes the Catch-22 of sepsis prevention and mitigation therapies. *EBioMedicine* 59:0–1.
161. Capelôa T, Benyahia Z, Zampieri LX, Blackman MCNM, Sonveaux P. 2020. Metabolic and non-metabolic pathways that control cancer resistance to anthracyclines. *Semin Cell Dev Biol* 98:181–191.
162. Sun X, Zhou L, Wang X, Li Y, Liu X, Chen Y, Zhong Z, Chen J. 2022. FYCO1 regulates migration, invasion, and invadopodia formation in HeLa cells through CDC42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway. *Biochem Cell Biol* 100:458–472.
163. Li X, He S, Ma B. 2020. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer* 19:1–16.

164. Cao W, Li J, Yang K, Cao D. 2021. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull Cancer* 108:304–322.
165. Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Panneer Selvam S, Ramshesh VK, Peterson YK, Lemasters JJ, Szulc ZM, Bielawski J, Ogretmen B. 2012. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol* 8:831–838.
166. Peralta ER, Edinger AL. 2009. Ceramide-induced starvation triggers homeostatic autophagy. *Autophagy* 5:407–409.
167. Alexaki A, Gupta S, Majumder S, Kono M, Tuymetova G, Harmon J, Dunn T, Proia R, 1Genetics. 2014. Autophagy regulates sphingolipid levels in the liver Aikaterini. *J Lipid Res* 55:2521–2531.
168. Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R, Codogno P. 2004. Ceramide-mediated Macroautophagy Involves Inhibition of Protein Kinase B and Up-regulation of Beclin 1. *J Biol Chem* 279:18384–18391.
169. Lai M, La Rocca V, Amato R, Freer G, Pistello M. 2019. Sphingolipid/ceramide pathways and autophagy in the onset and progression of melanoma: Novel therapeutic targets and opportunities. *Int J Mol Sci* 20.
170. Kyriakou K, Lederer CW, Kleanthous M, Drousiotou A, Malekkou A. 2020. Acid ceramidase depletion impairs neuronal survival and induces morphological defects in neurites associated with altered gene transcription and sphingolipid content. *Int J Mol Sci* 21:1–24.
171. Pyne NJ, Pyne S. 2010. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* 10:489–503.
172. Ghosal P, Sukocheva OA, Wang T, Mayne GC, Watson DI, Hussey DJ. 2016. Effects of chemotherapy agents on Sphingosine-1-Phosphate receptors expression in MCF-7 mammary cancer cells. *Biomed Pharmacother* 81:218–224.

173. Dasari S, Bernard Tchounwou P. 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740:364–378.
174. Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P, Kumar S. 2021. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *J Exp Pharmacol* 13:303–328.
175. Makovec T. 2019. Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol* 53:148–158.
176. Hajj C, Becker-Flegler KA, Haimovitz-Friedman A. 2015. Novel mechanisms of action of classical chemotherapeutic agents on sphingolipid pathways. *Biol Chem* 396:669–679.
177. Dupre T V., Doll MA, Shah PP, Sharp CN, Siow D, Megyesi J, Shayman J, Bielawska A, Bielawski J, Beverly LJ, Hernandez-Corbacho M, Clarke CJ, Snider AJ, Schnellmann RG, Obeid LM, Hannun YA, Siskind LJ. 2017. Inhibiting glucosylceramide synthase exacerbates cisplatin-induced acute kidney injury. *J Lipid Res* 58:1439–1452.
178. Tee Lim, Pei; Hing Goh, , Bey;Lee W-L. 2022. 3 - Taxol: Mechanisms of action against cancer, an update with current research. *Acad Press* 47–71.
179. YANG YH, MAO JW, TAN XL. 2020. Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel. *Chinese J Nat Med* 18:10–17.
180. Dimanche-Boitrel MT, Rebillard A. 2013. Sphingolipids and Response to Chemotherapy. *Handb Exp Pharmacol* 216:73–91.
181. Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, Cai Y, Norberg HV, Zhang T, Furuya T, Jin M, Zhu Z, Wang H, Yu J, Li Y, Hao Y, Choi A, Ke H, Ma D, Yuan J. 2011. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* 147:223–234.
182. Liu Q, Luo XY, Jiang H, Yang MH, Yuan GH, Tang Z, Wang H. 2014.

- Hydroxychloroquine facilitates autophagosome formation but not degradation to suppress the proliferation of cervical cancer SiHa cells. *Oncol Lett* 7:1057–1062.
183. Xu R, Sun W, Jin J, Obeid LM, Mao C. 2010. Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes. *FASEB J* 24:2507–2515.
 184. Singh J, Luqman S, Meena A. 2020. Emerging role of phytochemicals in targeting predictive, prognostic, and diagnostic biomarkers of lung cancer. *Food Chem Toxicol* 144:111592.
 185. Haberkant P, Raijmakers R, Wildwater M, Sachsenheimer T, Brügger B, Maeda K, Houweling M, Gavin AC, Schultz C, Van Meer G, Heck AJR, Holthuis JCM. 2013. In vivo profiling and visualization of cellular protein-lipid interactions using bifunctional fatty acids. *Angew Chemie - Int Ed* 52:4033–4038.

SOBRE ESTA TESIS

De este trabajo se deriva una publicación científica (noviembre 2023) en *Cells Journal* (DOI: 10.3390/cells12222588) con el título “Sphingolipid-based synergistic interactions to enhance chemosensitivity in lung cancer cells” (Anexo 8).

Adicionalmente, estos resultados fueron presentados en el evento *FEBS Special Meeting on Sphingolipid Biology: the dawn of a new era* (SLBiol2023), el pasado octubre 2023 en Funchal, Isla de Madeira, Portugal, donde la ponencia oral fue ganadora del premio “Short Talk Award” en el congreso (Anexo 5).

Posterior al evento en Portugal, se recibió una invitación para presentar los resultados en el evento *Glycolipid and Sphingolipid Biology* del *Gordon Research Seminar* (GRS) y *Gordon Research Conference* (GRC) que tuvo lugar en febrero 2024 en Galveston, Texas, EE.UU. En este último evento se presentaron los resultados tanto en forma oral (GRS) como en la sesión de poster (GRC) (Anexo 6).

Finalmente, estos resultados también fueron presentados en el evento *XV Sphingolipid Club Meeting*, mediante una ponencia oral, que tuvo lugar en la Universidad Friedrich-Alexander, en Erlangen, Alemania en setiembre 2024 (Anexo 7).

CAPÍTULO IX. ANEXOS

Anexo 1: Identificación de las principales quimioterapias con efectos sinérgicos en las líneas celulares A549 y MCF-9

Según los resultados preliminares obtenidos, se determina que las principales quimioterapias que tienen efectos sinérgicos con inhibidores de la vía de los SL son EPI, CIS y PAC, tanto para la línea celular de cáncer de mama (Figura 23) como para la línea celular de cáncer de pulmón (Figura 24).

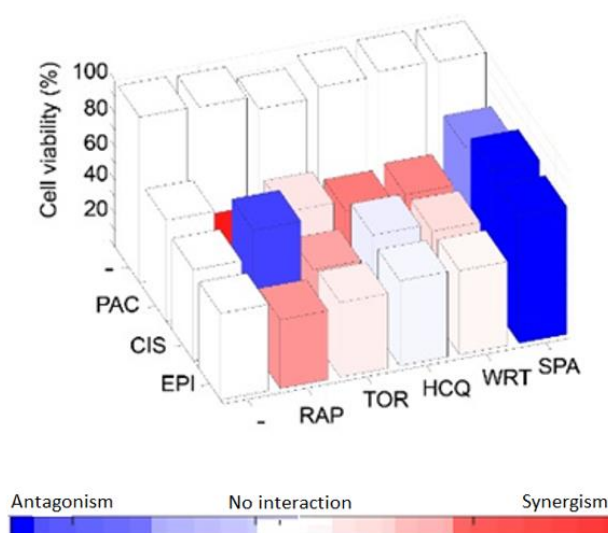


Figura 23. Análisis de viabilidad celular para la línea celular de cáncer de mama (MCF-7 – WT) para la determinación de las principales quimioterapias con efectos sinérgicos inductores de muerte celular (156).

TABLA 5: SINERGISMO 1 FOLD CON VIABILIDAD				
		EPI	CIS	PAC
	Individual	80,01	52,16	55,51
SKI	91,17	0,2	0,2	-0,3
PDMP	37,33	0,0	0,1	-0,2
DES	80,16	0,1	0,2	0,2
M	91,93	0,3	0,3	-0,2
D609	75,08	0,2	0,0	-0,2
D	70,99	0,4	0,2	-0,1
GW	69,79	0,1	0,1	0,1
MYR	63,77	0,1	0,2	0,0
RAP	84,96	0,5	0,2	-0,2
HCQ	65,05	0,1	0,2	-0,1
SPA	92,61	0,1	0,2	-0,4
TOR	65,72	0,4	0,2	0,0



Figura 24. Análisis de viabilidad celular para la línea celular de cáncer de pulmón (A549 – WT) para la determinación de las principales quimioterapias con efectos sinérgicos inductores de muerte celular (143).

Anexo 2: Diseño del protocolo de reconocimiento de imágenes (pipeline) para la evaluación de la sonda fluorescente SM-BOD en las líneas celulares A549– WT y MCF-7– WT.

A continuación, se presenta el protocolo diseñado para el reconocimiento de imágenes que permitió el análisis del metabolismo de la sonda fluorescente SM-BOD mediante el *software* CellProfiler, en su configuración general (Figura 25) y el detalle del pipeline con cada módulo diseñado (Figura 26).

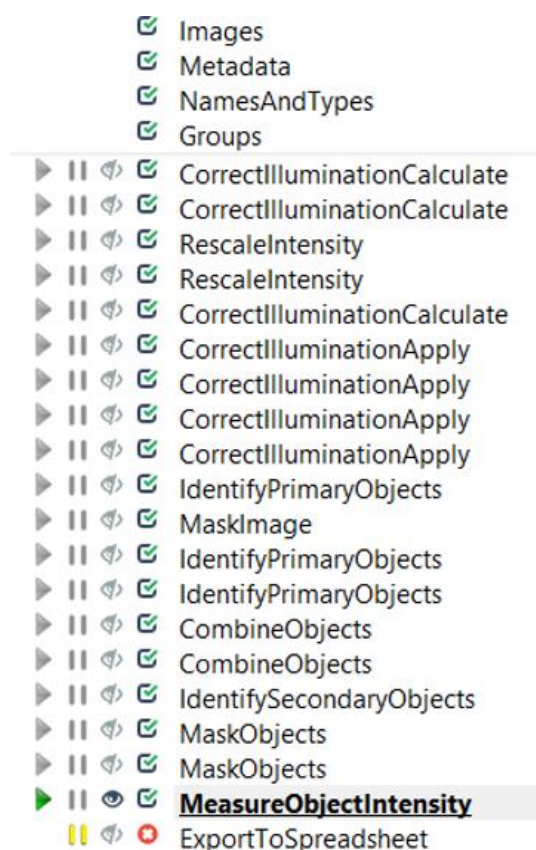


Figura 25. Pipeline general para la evaluación de la sonda fluorescente SM-BOD en las líneas celulares A549 – WT y MCF – 7. **Fuente:** extraído del pipeline elaborado en el *software* CellProfiler.

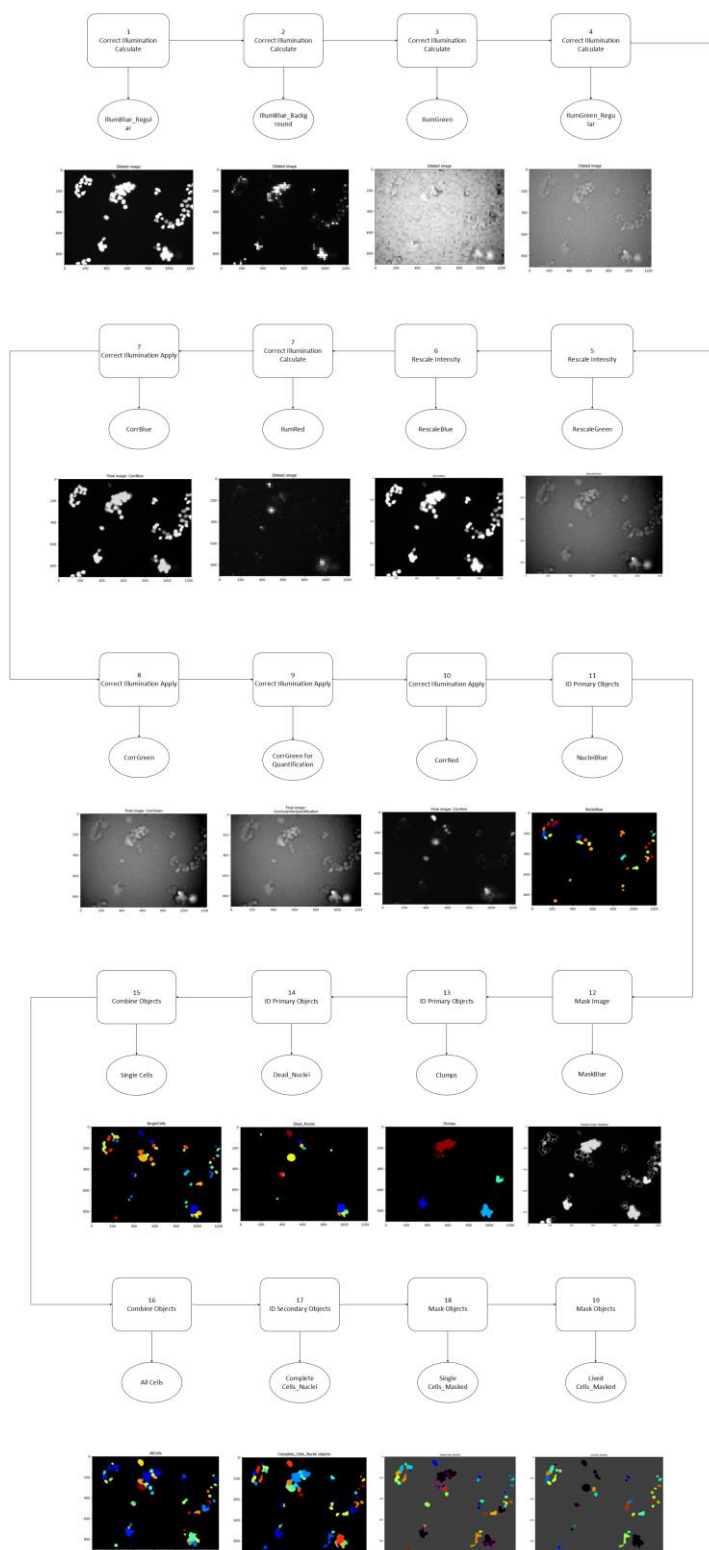


Figura 26. Pipeline detallado para la evaluación de la sonda SM-BOD en la línea celular de cáncer de pulmón A549– WT. Fuente: elaboración propia mediante los resultados obtenidos del *software* CellProfiler.

Anexo 3: Diseño del protocolo de reconocimiento de imágenes (pipeline) para la evaluación del flujo autofágico en las líneas celulares estables A549– LC3/m-Cherry y MCF-7– LC3/m-Cherry.

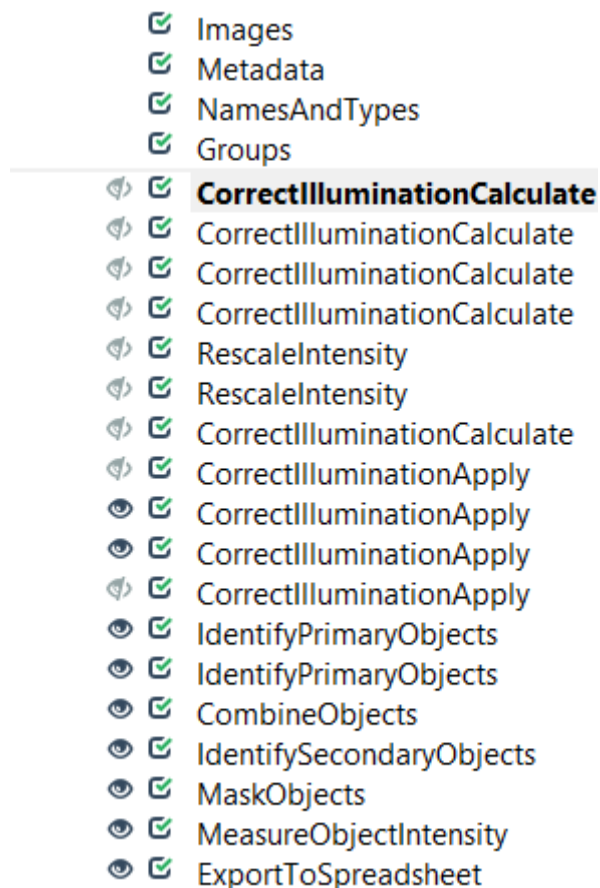


Figura 27. Pipeline general para la evaluación del flujo autofágico en las líneas celulares estables A549– LC3/m-Cherry y MCF-7– LC3/m-Cherry. **Fuente:** extraído del pipeline elaborado en el software CellProfiler.

Anexo 4: Síntesis de un esfingolípido bifuncional de ácido graso (pacFA) para comparar su funcionalidad en el metabolismo de esfingolípidos con la sonda fluorescente SM-BOD

Los esfingolípidos bifuncionales (SL-Bif) son especies a las que químicamente se les une grupos fotoactivables (grupo diazirina) y *clickables* (grupo alquino terminal) que no interfieren significativamente con su actividad biológica (Figura 29A) (149).

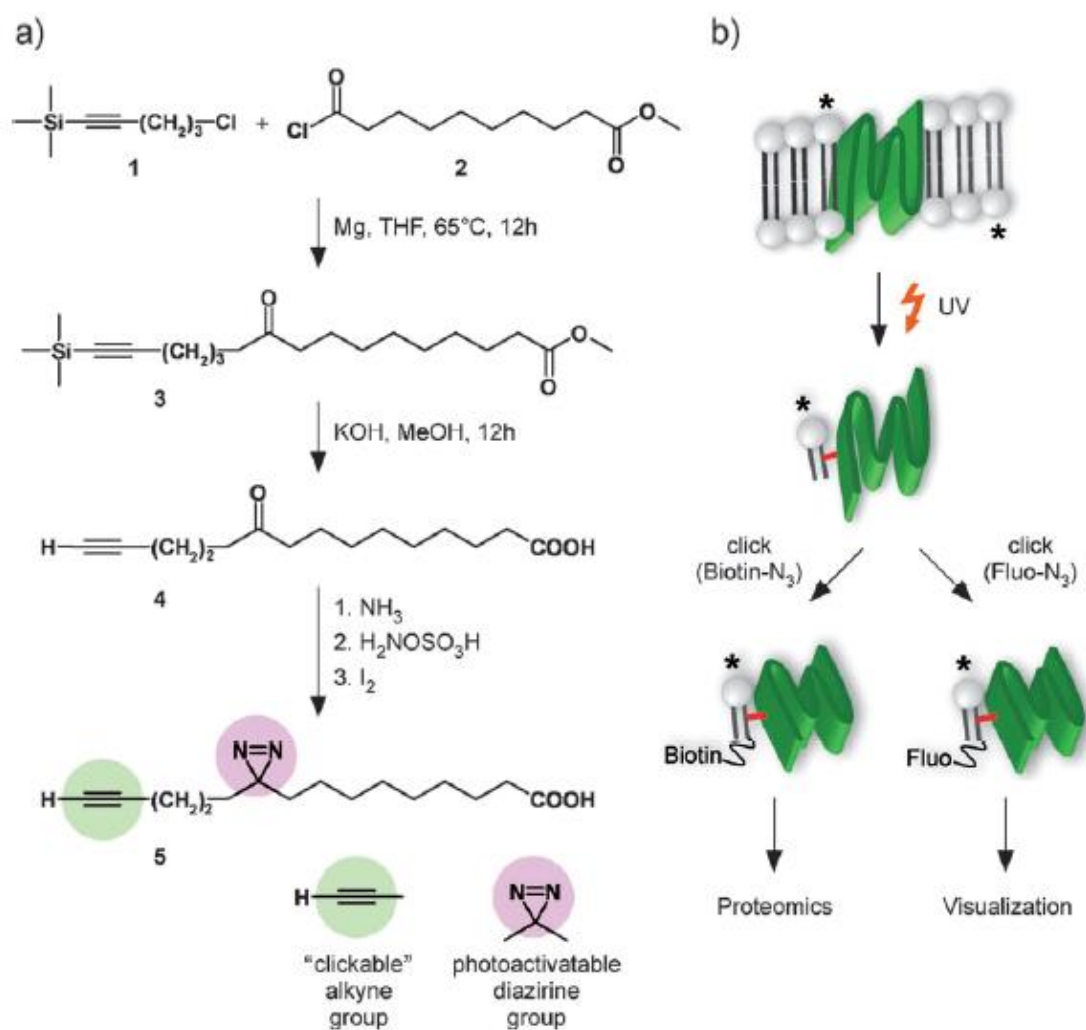


Figura 29. Reacción de click para la formación de esfingolípidos bifuncionales. (A) Síntesis de un esfingolípido bifuncional de ácido graso (pacFA). (B) Esquema general del perfil in vivo de las interacciones celulares de lípido-proteína. **Fuente:** tomado de Haberkant *et al.* (2013) (185).

Mediante esta tecnología, la fotoactivación con radiación ultravioleta (UV) permite que el SL interactúe con una proteína transmembrana, lo cual promueve el entrecruzamiento químico y “fijación” del SL a esta proteína. En un segundo paso, el grupo *clickable* se derivatiza con una molécula reportera, como lo puede ser un fluoróforo, de manera que la molécula se une a la sonda mediante una reacción de click (*click reaction*), permitiendo revelar o visualizar, incluso purificar, el complejo lípido-proteína entrecruzado mediante microscopía (Figura 29A); adicionalmente, se pueden realizar análisis de proteómica para validar resultados (Figura 29B) y así evidenciar la actividad biológica del SL (149, 185).

Estos SL-Bif se originan a partir de esfingosina bifuncional (llamada pacSo), la cual se incorpora al metabolismo tal y como sucede con la So endógena, llevando a la producción de especies bifuncionales de ceramida (pacCer), esfingomielina (pacSM), glucosilceramida (pacGlu-Cer) y otros que pueden ser monitoreados por métodos cromatográficos y microscópicos (185). Así se puede rastrear de manera más directa el comportamiento dinámico de las especies de la vía de SL, sin la interferencia de grupos que generen impedimento estérico (como la sonda BODIPY) en la señalización celular (126).

Anexo 5: Participación en el congreso *FEBS Special Meeting, Sphingolipids Biology: the dawn of a new era*, que tuvo lugar en la Isla de Madeira, Portugal, del 8 al 13 de Octubre, 2023.



Federation of European Biochemical Societies (FEBS)
Suite B1, Third Floor, St Andrew's House, 19 St Andrew's Street
Cambridge, CB2 3BZ
United Kingdom

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

Susana Mesén-Porras

attended the FEBS Special Meeting
Sphingolipid Biology: the dawn of a new era
held on 8-13 October 2023 | Funchal, Portugal

Learn more about
FEBS courses
at www.febs.org

A handwritten signature in black ink, reading "Beáta G. Vértessy".

Prof. Beáta G. Vértessy
Chair of the FEBS Advanced Courses Committee

Federation of European Biochemical Societies
www.febs.org



Sphingolipid Biology

FEBS Special Meeting
2023

The dawn of a new era

October 8-13, 2023

Funchal, Madeira Island, Portugal



Short Talk Award

The Sphingolipid Biology Team congratulates

Susana Mesén-Porras

for the outstanding short talk presented at the FEBS Special Meeting on
Sphingolipid Biology: the dawn of a new era.
Congratulations on your accomplishment!

The Sphingolipid Biology Team

Rodrigo Mora-Rodríguez

13th October 2023



Laboratorio de
Quimiosensibilidad
Tumoral LQT

CICICA



Sphingolipid-based synergistic interactions to enhance chemosensitivity in lung cancer cells

Susana Mesén-Porras, Andrea Rojas-Céspedes, José Molina-Mora, José Roberto Vega-Baudrit, Francisco Siles, Steve Quiros and Rodrigo Mora-Rodríguez

Susana Mesén - Porras
susana.mesen@ucr.ac.cr



Anexo 6: Participación en el congreso *Gordon Research Seminar* (GRS - presentando un *Short Talk*) y *Gordon Research Conference* (GRC - presentando un *poster*), que tuvo lugar en Galveston, Texas, EE.UU, del 17 al 23 de Febrero, 2024.

 Certificate of Participation

March 4th 2024

Susana Mesén-Porrás
University of Costa Rica/ National Laboratory in Nanotechnology
San José, Costa Rica
San José San José
Costa Rica

This letter certifies your participation as a(n) Speaker at the Gordon Research Seminar on Glycolipid and Sphingolipid Biology held 02/17/2024 - 02/18/2024 at Grand Galvez in Galveston, Texas, United States.

Poster Entitled: *Sphingolipid-Based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells*



Dr. Nancy Ryan Gray
President and Chief Executive Officer
Gordon Research Conferences

 Certificate of Participation

March 4th 2024

Susana Mesén-Porras
University of Costa Rica/ National Laboratory in Nanotechnology
San José, Costa Rica
San José San José
Costa Rica

This letter certifies your participation as a(n) Attendee at the Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology held 02/18/2024 - 02/23/2024 at Grand Galvez in Galveston, Texas, United States.

Poster Entitled: Sphingolipid-Based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells



Dr. Nancy Ryan Gray
President and Chief Executive Officer
Gordon Research Conferences

Para el seminario (GRS):

Sphingolipid-based synergistic interactions to enhance chemosensitivity in lung cancer cells

Susana Mesén-Porras, Andrea Rojas-Céspedes, José Molina-Mora, J.Roberto Vega-Baudrit, Francisco Siles, Steve Quiros and Rodrigo Mora-Rodríguez

Susana Mesén - Porras
susana.mesen@ucr.ac.cr



Para la conferencia (GRC):



Sphingolipid-Based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells



Susana Mesén-Porras^{1,2,3,4}, Andrea Rojas-Céspedes¹, José Arturo Molina-Mora¹, José Vega-Baudrit⁴, Francisco Siles^{2,5}, Steve Quiros^{1,2} and Rodrigo Mora-Rodríguez^{1,2,3,*}

1. Research Center on Tropical Diseases (CIET), University of Costa Rica. 2. Research Center on Surgery and Cancer (CICICA), University of Costa Rica. 3. Master Program in Microbiology, University of Costa Rica. 4. National Laboratory of Nanotechnology (LANOTEC), National Center of High Technology (CeNAT), Costa Rica. 5. Pattern Recognition and Intelligent Systems Laboratory (PRIS-Lab), University of Costa Rica.

* Correspondence: rodrigo.morarodriguez@ucr.ac.cr; Tel.: +506-2511-8635



CONCLUSIONS

- We suggest a strategy for combinatorial drug treatment aimed at increasing the levels of anti-tumoral sphingolipids in critical compartments, leading to synergistic interactions to enhance the anti-neoplastic effects of chemotherapy.
- Our results revealed significant synergy, particularly between epirubicin and autophagy inducers (rapamycin and Torin), leading to a strong reduction in cell viability. Cisplatin also demonstrated synergistic effects when combined with a ceramide inhibitor. However, paclitaxel often exhibited antagonistic effects when used in combination with these modifiers.
- The model we proposed provided critical insights into the influence of chemotherapy on the sphingolipid pathway, suggesting that combining chemotherapies with autophagy inducers increases vesicle formation, potentially leading to ceramide accumulation, which triggers cell death.
- Via an analysis of sphingolipid metabolism and autophagic flux in the context of chemotherapeutic interactions using an A549 lung cancer model, our results establish the basis for the design of new therapeutic protocols with potential clinical applications with the aim to enhance chemosensitivity in heterogeneous tumors and thus improve the efficiency and efficacy of cancer treatments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge the administrative support of CICICA and CIET



REFERENCES

- Int. J. Med. Med. 2019, 43, 647–656.
- Curr. Pharm. Des. 2010, 16, 3–10.
- The Cell: A Molecular Approach, 5th ed; Garland Science, 2016.
- Glia. 2010, 58, 1164–1183.
- Elsevier Ltd-The Netherlands, 2018, 148, ISBN 9780128142253.
- Comput. Biol. Med. 2018, 97, 8–20.
- Universia 2022, 56, 687–701.

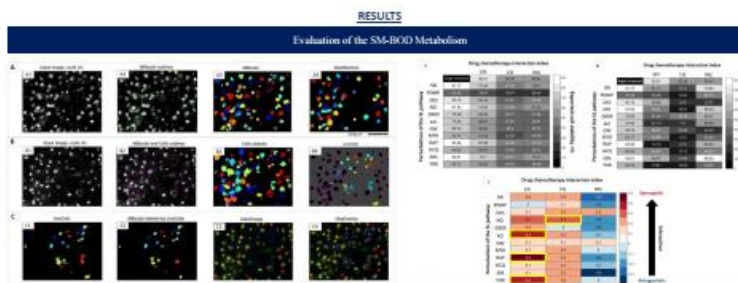


Figure 1. Kinetic assay based on image segmentation to evaluate the effect of single and double perturbations on the SL pathway. (A) Nuclei analysis stained with Hoechst and propidium iodide (PI) using DAPI and Texas Red channels, respectively. (B) Sphingomyelin-BODIPY (SM-BOD) probe analysis by GFP channel. (C) Cell viability analysis. Scale: 100 µm.

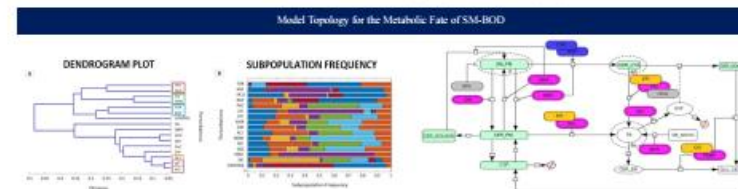


Figure 2. Viability assay to search for synergistic interactions (chemotherapy-inhibitor interactions) for the A549 cell line. (A) Percentage of expected cell viability for single and double treatments. (B) Percentage of experimental cell viability for single and double treatments. (C) Synergistic and antagonistic interactions of chemotherapeutic drugs and perturbations of the SL pathway.

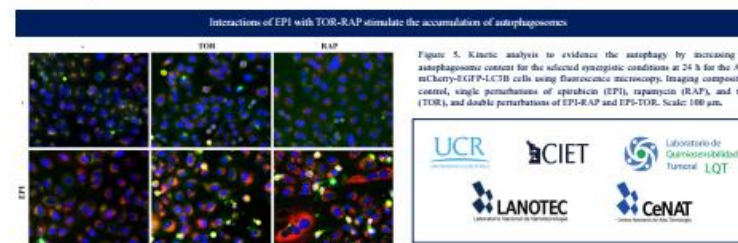


Figure 3. Heterogeneity profile for inferring the effect of unknown perturbations. (A) Dendrogram plot. The enclosed pairs are the interactions of interest. (B) Subpopulation frequency related to the perturbations applied. The different colors presented correspond to different cell subpopulations.

Figure 4. Model topology for the A549 cell line based on the metabolism of SM-BOD with the autophagic process. (dotted circles) P: phosphorus, AP: autophagosome and AL: autophagolysosome) to infer the perturbation behavior of the chemotherapeutic agents and inhibitors within the SL pathway.



Anexo 7: Participación en el congreso *XV Sphingolipid Club Meeting*, que tuvo lugar en Erlangen, Alemania, del 3 al 7 de Setiembre, 2024.



SPHINGOLIPID CLUB

Via Eugubina 66/1
06126 Perugia (PG), Italy
www.sphingolipidclub.com



Sponsored by

**BEST LECTURE AWARD**

is awarded to

SUSANA MESEN-PORRAS

for the lecture

**SPHINGOLIPID-BASED SYNERGISTIC INTERACTIONS TO
ENHANCE CHEMOSENSITIVITY IN LUNG CANCER CELLS**

**XV SPHINGOLIPID CLUB MEETING
in Erlangen, Germany, 3-7 September 2024**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Ghidoni".

RICCARDO GHIDONI
President of the Sphingolipid Club

A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. Müller".

CHRISTIAN P. MÜLLER
Chairman Coordinator



Universität Stuttgart



CICICA

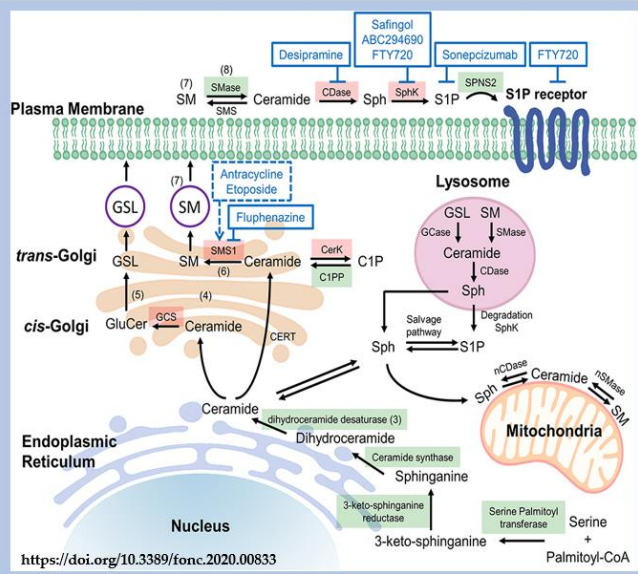


Sphingolipid-based synergistic interactions to enhance chemosensitivity in lung cancer cells

Susana Mesén – Porras
susana.mesen@ucr.ac.cr



<https://doi.org/10.3390/cells1222588>



Anexo 8: Artículo científico publicado “Sphingolipid-based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells” con los resultados de la tesis, en la revista *Cells*, en Noviembre 2023 (DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12222588>).



Article

Sphingolipid-Based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells

Susana Mesén-Porras, Andrea Rojas-Céspedes, José Arturo Molina-Mora, José Vega-Baudrit, Francisco Siles, Steve Quiros and Rodrigo Mora-Rodríguez

Special Issue

Sphingolipid Signaling and Human Disease 2022

Edited by







Dr. Nawajes Mandal and Dr. Kazuyuki Kitatani



<https://doi.org/10.3390/cells12222588>

Article

Sphingolipid-Based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells

Susana Mesén-Porras ^{1,2,3,4} , Andrea Rojas-Céspedes ¹, José Arturo Molina-Mora ¹ , José Vega-Baudrit ⁴ , Francisco Siles ^{2,5} , Steve Quiros ^{1,2}  and Rodrigo Mora-Rodríguez ^{1,2,3,*} 

- ¹ Research Center on Tropical Diseases (CIET), Faculty of Microbiology, University of Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica; susana.mesen@ucr.ac.cr (S.M.-P.); andrea.rojascespedes@ucr.ac.cr (A.R.-C.); jose.molinamora@ucr.ac.cr (J.A.M.-M.); steve.quiros@ucr.ac.cr (S.Q.)
- ² Research Center on Surgery and Cancer (CICCA), Campus Rodrigo Facio, University of Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica; francisco.siles@ucr.ac.cr
- ³ Master Program in Microbiology, University of Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica
- ⁴ National Laboratory of Nanotechnology (LANOTEC), National Center of High Technology (CeNAT), Pavas, San José 1174-1200, Costa Rica; jvegab@gmail.com
- ⁵ Pattern Recognition and Intelligent Systems Laboratory (PRIS-Lab), Department and Postgraduate Studies in Electrical Engineering, University of Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica
- * Correspondence: rodrigo.morarodriguez@ucr.ac.cr; Tel.: +506-2511-8635

Abstract: Tumor heterogeneity leads to drug resistance in cancer treatment with the crucial role of sphingolipids in cell fate and stress signaling. We analyzed sphingolipid metabolism and autophagic flux to study chemotherapeutic interactions on the A549 lung cancer model. Loaded cells with fluorescent sphingomyelin analog (BODIPY) and mCherry-EGFP-LC3B were used to track autophagic flux and assess cytotoxicity when cells are exposed to chemotherapy (epirubicin, cisplatin, and paclitaxel) together with sphingolipid pathway inhibitors and autophagy modulators. Our cell model approach employed fluorescent sphingolipid biosensors and a Gaussian Mixture Model of cell heterogeneity profiles to map the influence of chemotherapy on the sphingolipid pathway and infer potential synergistic interactions. Results showed significant synergy, especially when combining epirubicin with autophagy inducers (rapamycin and Torin), reducing cell viability. Cisplatin also synergized with a ceramidase inhibitor. However, paclitaxel often led to antagonistic effects. Our mapping model suggests that combining chemotherapies with autophagy inducers increases vesicle formation, possibly linked to ceramide accumulation, triggering cell death. However, the *in silico* model proposed ceramide accumulation in autophagosomes, and kinetic analysis provided evidence of sphingolipid colocalization in autophagosomes. Further research is needed to identify specific sphingolipids accumulating in autophagosomes. These findings offer insights into potential strategies for overcoming chemotherapy resistance by targeting the sphingolipid pathway.

Keywords: cancer; sphingolipids pathway; BODIPY; synergisms; autophagy



Citation: Mesén-Porras, S.; Rojas-Céspedes, A.; Molina-Mora, J.A.; Vega-Baudrit, J.; Siles, F.; Quiros, S.; Mora-Rodríguez, R. Sphingolipid-Based Synergistic Interactions to Enhance Chemosensitivity in Lung Cancer Cells. *Cells* **2023**, *12*, 2588. <https://doi.org/10.3390/cells12222588>

Academic Editors: Nawajet Mandal and Kazuyuki Kitatani

Received: 15 September 2023

Revised: 13 October 2023

Accepted: 25 October 2023

Published: 8 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

As one of the leading causes of mortality, cancer constitutes an important health burden worldwide [1,2] associated with aging and population lifestyle [3]. Cancer is associated with the unregulated proliferation of tumor cells; rather than responding appropriately to the signals that control normal cell behavior, cancer cells grow and divide uncontrolled [4]. Indeed, cancer cells can invade normal tissues and organs and eventually spread throughout the body [4,5]. The non-specific systemic inflammation from metastases is the major cause of mortality in cancer [1].

During this dynamic disease, cancers generally become more heterogeneous. As a result of this heterogeneity, the tumor might include a diverse collection of cells harboring distinct molecular characteristics [6,7]. Cellular heterogeneity confers tumor robustness

against chemotherapy, and this property of chemoresistance continues to be the main obstacle to the effective treatment of cancer patients [8,9]. In addition, the DNA sequence can be changed due to copying errors introduced by DNA polymerases during replication. The importance of DNA damage and repair became evident because carcinogens are mutagens and cause a change in the DNA sequence [10]. Thus, carcinogens target the genetic material, contributing to the evolution of cancer cells toward more malignant phenotypes [11].

Lung cancer cells present defects in regulating normal cell proliferation and homeostasis because of a series of genetic and epigenetic alterations that trigger the processes of invasion, metastasis, and resistance to cancer therapy [12,13]. Additionally, due to its incidence and mortality, this kind of cancer has been the most common cancer worldwide since 1985 [14,15]. Therefore, we are interested in studying lung cancer cell lines as experimental models to identify potential strategies to overcome chemotherapy resistance, focusing on the sphingolipid pathway.

Indeed, sphingolipids (SLs) are one of the major classes of lipids that are present in the plasma membrane of eukaryotic cells [16]; the SL has a hydrophobic region of a sphingoid long-chain base and a fatty acid linked by an amide bond [17]. The sphingolipid signaling pathway (SL pathway) is a complex biological system that integrates different cellular stress signals and reports dynamic phenotypes related to the induction of cell death pathways [18]. Thus, the balance of certain SLs defines cell fate, which plays an important role in various aspects of cancer biology, including apoptosis, cell proliferation, cell migration, senescence, and inflammation [19–21].

The major metabolites involved in the regulation of mechanisms related to cancer biology are ceramide (Cer), sphingosine (So), and its phosphorylated metabolites ceramide 1-phosphate (C1P) and sphingosine 1-phosphate (S1P), respectively [22,23]. The balance between pro-death and pro-survival metabolites determines the cell fate, and the system that keeps this balance is called SL-rheostat [24,25]. Several studies report that Cer, So, S1P, and glucosylceramide (GluCer) are regulators in apoptosis, cell proliferation, cell migration, senescence, or inflammation processes [26]. So and Cer promote signaling mechanisms associated with cell death, such as apoptosis induction, cell cycle arrest, cell differentiation, and senescence, so that So and Cer are categorized as anti-tumor or pro-cell death sphingolipids [16,27]. Meanwhile, the glycosylation of Cer and the consequent formation of GluCer has been established as a marker of multidrug resistance [28], and it functions as a pro-survival sphingolipid [16,27]. In contrast, S1P and C1P are potent molecules inducing cell proliferation [18,22].

The changes can strongly influence this SL pathway's availability of enzyme substrates in several compartments, such as the lysosome [29]. It therefore can be potentially altered by the autophagic flux of sphingolipids. Autophagy involves enclosing damaged proteins and organelles within membrane structures and delivering these molecules to the lytic compartments [30,31]. It is induced in response to starvation, reactive oxygen species, hypoxia, infection, and drugs [25,29,31]. This process is subdivided into three types: microautophagy, where lysosomes engulf cytosolic components; chaperone-mediated autophagy, which uses transport proteins for moving components into lysosome; and macroautophagy, where proteins and organelles are enclosed into autophagolysosomes (autophagosomes that merge with lysosomes), to complete the degradation [32].

Autophagy begins with the formation of the phagophore, mediated by the ULK1 complex; then, phagophore nucleation requires the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) complex (ATG14L, VPS34, Beclin-1, and VPS15 proteins) to form the autophagosome. Autophagosomes require the lipidation of LC3 to form LC3II, and finally, the autophagosome fuses with a lysosome, forming the autophagolysosome, leading to the degradation of the cargo organelles and cytosolic proteins [25,29,31].

In addition, previous reports suggest that the progression of autophagy depends on sphingolipid production [31], attributable to its role in the formation of autophagosomes, the maturation of vacuolar proteases, or the formation of the pre-autophagosomal

structure [31,33]. The role of S1P receptor expression was also linked to the regulation of autophagy; according to Ghosal et al. (2016), changes in S1P receptor expression are concurrent to the activation of autophagy, likely directing cancer cells toward death [34]. S1P receptors have been identified as mediators of autophagy and proinflammatory effects [35,36].

PI3K is the enzyme that produces the phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) and regulates the trafficking of proteins and vesicles, and it is involved in phagophore formation. The mechanism involved in the fusion of incoming membranes to phagophore is regulated by PI3K and the Unc-51-like autophagy-activating kinase (ULK); these enzymes promote the formation and stabilization of phagophore curvature via the production of PI3P, regulating the double membrane formation [29]. Acid sphingomyelinase is mainly located within the endosomal/lysosomal compartment, and it is correlated with the cellular stress response and may become preferentially transported to the outer cell membrane [37]. Finally, the fusion of the autophagosome with the lysosome to produce the "autolysosome" is mediated by the small G protein Rab7 and cellular cytoskeleton [29].

In addition, it is known that autophagy is a metabolic process that contributes to cell death and its regulation [38]. However, it is unknown whether the regulation of cell death by autophagy is influenced by its effect on the availability of SL enzyme substrates upon changes in the flux of membranes from the autophagosomes to the lysosomes. Hence, LC3-II/LC3-PE is the only protein known to be directly associated with the autophagosomal membrane throughout the process of autophagy and thus is a widely used marker of autophagosomes [25,39]. In this study, we will analyze the behavior of autophagy modulators such as Rapamycin (RAP), Hydroxychloroquine (HCQ), Spautin (SPA), and Torin (TOR) when they are combined with chemotherapeutic drugs to treat cancer cells in the presence of a fluorescent SL biosensor to map the effects of such perturbations on the SL pathway.

Fluorescent sphingolipids analogs (SL-analogs) have been extensively used to study the dynamics and structure of plasma membranes. BODIPY fluorophore is one of the highlight SL-analogs to study the SL synthesis and transport along secretory pathways in eukaryotic cells. Also, it is useful for visualizing membrane domains in living cells based on concentration-dependent fluorescence properties [40,41].

Our previous studies included *in vitro* and *in silico* assays to identify metabolic differences in the SL-rheostat of murine glioma cells with astrocytes using an SM-BOD probe (sphingomyelin labeled with BODIPY). We inferred the SL metabolic pathway topology related to the probe movement in different cell compartments [23]. Moreover, SM-BOD was used to analyze the SL distribution in plasma membranes [42]. Afterward, we constructed and fitted a dynamic mathematical model based on the metabolism kinetics of the SM-BOD probe to simulate the total fluorescent level changes upon perturbations. We combined the ordinary differential equations (ODE) to infer the metabolism of SM-BOD with Gaussian Mixture Modeling (GMM) to map how the chemotherapy is sensed in the SL pathway based on cell heterogeneity profiles [43] and a fuzzy logic model to derive rules for making predictions about drug combinations to enhance cell death and overcome thereby the drug resistance [44,45].

In the current report, we aimed to identify the possible mechanism of synergistic interactions of chemotherapy with inhibitors of SL-pathway enzymes and autophagy modulators imaging the behavior of a fluorescent sphingolipid analog as a biosensor to map the activity of each drug on a simple network of the SL pathway by the similarity in their perturbation-based heterogeneity profiles. Once mapped, it is possible to infer the changes in SL composition upon drug combinations to formulate a hypothesis for those synergistic interactions. Hereby, we report that epirubicin has a significant synergistic cytotoxicity when combined with the autophagy inducers Torin and rapamycin or the acid/neutral ceramidase inhibitors. The mapping of these perturbations to the SL pathway suggests that those drug combinations induce the colocalization of SLs in several cell compartments, potentially explaining the strong increase in cytotoxicity. The experimental evaluation of these interactions suggests that combining autophagy inducers with epirubicin leads to a

strong colocalization of SLs. This sphingolipid-centered rationale for drug combination offers an interesting strategy to overcome drug resistance. It highlights the importance of the SL pathway as a stress biosensor for cell fate decisions.

2. Materials and Methods

The methodology described here is based on our previous publications (Quiros et al. (2018) and Molina et al. (2018)); however, we adapted the procedure to our cancer cell line [43,44].

2.1. Cell Culture for A549 Wild Type (WT)

To evaluate the SL composition, an A549 lung cancer cell line (WT) from a human lung carcinoma obtained from the NCI-60 panel was grown. The culture medium was RPMI (1640 Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), supplemented with 1% of penicillin, streptomycin, and amphotericin B (Anti-Anti Gibco, Life Technologies, Roskilde, Denmark); L-alanyl-L-glutamine 1% (GlutaMAX Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and fetal bovine serum 10% (FBS Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, USA). The cultures were incubated at 37 °C (CO₂ 5%), and trypsin (TryPLE™ Express Gibco, Life Technologies, Roskilde, Denmark) was used to dissociate adherent cells.

2.2. mCherry-EGFP-LC3B Retroviral Vectors Assembly

Retroviral particles were generated in 60% confluent A549 cells monolayers via triple transfection with polyethylenimine (Polysciences 23966) of the transfer plasmid pBABE-puro mCherry-EGFP-LC3B [46] (provided by Jayanta Debnath, Addgene plasmid #22418), the packaging plasmid pCL-Eco (provided by Inder Verma, Addgene plasmid #12371), and the envelope plasmid pMD2.G (provided by Didier Trono, Addgene plasmid #12259) [47]. At 72 h post-transfection, virus-containing media were collected, filtered through a 0.45 µm pore membrane, supplemented with 5 µg/mL polybrene (Sigma H9268, St. Louis, MO, USA), and stored at −80 °C.

2.3. Generation and Sorting of Stable A549 mCherry-EGFP-LC3B Cell Line

A549 cell monolayers (80% confluency) were transduced with retroviral particles carrying the mCherry-LC3B construct and centrifuged for 2 h at 453 g at 25 °C. At 72 h post-transduction, cells were selected with 4 µg/mL puromycin (Sigma P8833) in RPMI 1640 with 10% FBS for 2 days. Cell sub-populations with homogeneous expression levels of the mCherry-LC3B construct were isolated for each cell line via fluorescence-activated cell sorting in a BD FACSJazz™ cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Sorted cells were cultured in RPMI 1640 with 10% FBS with 4 µg/mL puromycin. The A549 mCherry-EGFP-LC3B cell line allowed us to track the autophagy process in the kinetic assay for the SL metabolism.

2.4. Evaluation of the SM-BOD Metabolism

To evaluate the kinetics, lung cancer cells (A549 WT and A549 mCherry-EGFP-LC3B) were treated with an SM-BODIPY fluorescent probe (Invitrogen™, Eugene, OR, USA), which was incorporated into the metabolism by the respective cellular machinery. In a 96-well plate, the A549 cell line was plated using a volume of 100 µL/well of cell suspension (supplemented RPMI 1640: FBS 10%, anti-anti 1%, and GlutaMAX 1%) at 1.5×10^5 cells/mL. It was incubated at 37 °C for 24 h (CO₂ 5%) to promote cellular adhesion. Then, the culture medium was removed, and 50 µL of non-supplemented RPMI (FBS 0%, anti-anti 1%, and GlutaMAX 1%) containing SM-BOD 2 µM (BODIPY FL C5 SPHINGOMYELIN Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA) and Hoechst 3.8 µg/mL (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA) were added. Staining was incubated for 10 min at 37 °C; when the incubation time finished, 2 washes with 100 µL of non-supplemented RPMI were added immediately.

Next, 50 μL of supplemented RPMI was added to each well of the plate with FBS 1% and propidium iodide (PI) 0.02 mg/mL. Previously, we standardized that with those concentrations of FBS and PI, the image definition obtained from the fluorescence microscopy was optimum, and the background noise was minimal. After that, we design a kinetic assay to evaluate synergisms or antagonisms of single and double perturbations. Thus, 50 μL /well of inhibitors of the sphingolipid pathway, autophagy modulators, chemotherapeutic drugs, or culture medium (controls) were added to the RPMI medium (FBS 1%, anti-anti 1%, GlutaMAX 1%, and PI 0.02 mg/mL).

Double treatments combined chemotherapies and perturbations (inhibitors of the SL pathway or autophagy modulators). The inhibitors of SL pathway enzymes were SKI (Sphingosine kinase II inhibitor, 4.13 μM , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), PDMP (Glucosyl ceramide synthase inhibitor, 29.26 μM , ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), DES (Desipramine, acid sphingomyelinase inhibitor and acid ceramidase, 10.32 μM , ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), NCI (Neutral/alkaline ceramidase inhibitor, 110.62 μM , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), D609 (Sphingomyelin synthase inhibitor, 187.62 μM , ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), ACI (Acid ceramidase inhibitor, 5.92 μM , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), GW (Neutral sphingomyelinase inhibitor, 1.16 μM , Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), and MYR (Myriocin, serine palmitoyltransferase inhibitor, 12.46 μM , EMD Millipore Corp, Danvers, MA, USA).

The chemotherapeutic drugs evaluated included EPI (epirubicin, 0.58 μM , Sandoz, Vienna, Austria), CIS (cisplatin, 13.32 μM , Pfizer, Sydney, Australia), and PAC (paclitaxel, 1.76 μM , AqVida, Hamburg, Germany). The autophagy modulators were RAP (Rapamycin, 1.00 μM , Sigma-Aldrich), HCQ (Hydroxychloroquine-1, 25.00 μM , Sigma-Aldrich), SPA (Spautin-2, 40.00 μM , Sigma-Aldrich), and TOR (Torin-2, 1.00 μM , Sigma-Aldrich).

To monitor the behavior of the SM-BOD sensor against different perturbations, fluorescence images were acquired using automated fluorescence microscopy (Cytation 3TM, Biotek, Winooski, VT, USA) with DAPI, Texas Red, and GFP channel every 6 h for 72 h (Figure 1). Furthermore, an automatic analysis with CellProfiler 4.1.3 software (www.cellprofiler.org 28 November 2022) allowed us to obtain 153 fluorescence features with single-cell resolution, including texture, morphology, and intensity features; moreover, this protocol estimated the cytotoxicity of each perturbation using PI stain to evaluate synergisms or antagonisms of double treatments.

According to the cytotoxicity data obtained from CellProfiler software, it was possible to obtain synergistic or antagonistic values (shown in Figure 2) using the following equations [48]:

$$\text{Experimental cytotoxicity}(\%) = \frac{\text{dead cells}}{\text{total cells}} \quad (1)$$

$$\text{Experimental viability}(\%) = 100 - (\text{Experimental cytotoxicity}\%) \quad (2)$$

$$\text{Expected viability}(\%) = \frac{\text{single viability}_1(\%) \times \text{single viability}_2(\%)}{100} \quad (3)$$

Single viability 1 : Single interaction for the chemotherapeutic drug

Single viability 2 : Single interaction for the inhibitor of the SL pathway

$$\text{Double interaction}(\%) = (\text{Expected viability}) - (\text{Experimental viability}) \quad (4)$$

$$\text{Interaction ratio} = \frac{\text{Double interaction}(\%)}{100} \quad (5)$$

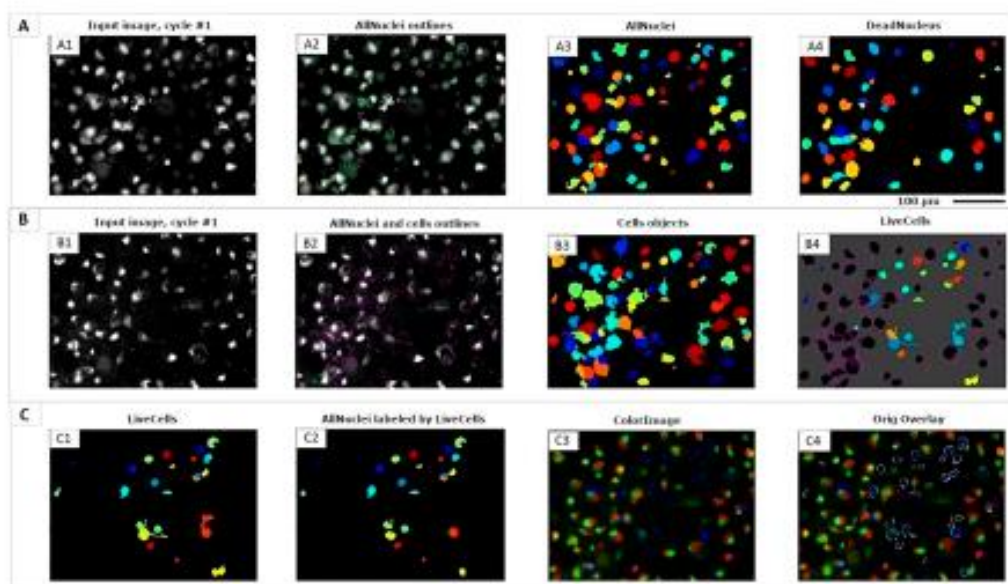


Figure 1. Imaging analysis for the subcellular segmentation (nuclei/cytoplasm) for the lung cancer cell model (A549 WT) by fluorescence microscopy. (A) Nuclei analysis stained with Hoechst and propidium iodide (PI) using DAPI and Texas Red channels, respectively; (A1) nuclei of all cells obtained by adding the signal emitted by DAPI and Texas Red channels; (A2) nuclear recognition by the protocol designed using CellProfiler software; (A3) nuclei identification of all detected cells; (A4) nuclei identification of dead cells by Texas Red channel. (B) SM-BOD probe analysis by GFP channel; (B1) sphingolipids labeled with the fluorescent probe; (B2) complete cells recognition by the protocol designed using CellProfiler software; (B3) identification of all complete cells; (B4) dead cell (A4) removal from the complete cells identified in b3 to obtain only live cells. (C) Cell viability analysis; (C1) complete viable cells; (C2) nuclei viable cells; (C3) tricolor image of signals from DAPI, GFP, and Texas Red channels for all cells; (C4) live cells removal from the complete cells to identify the overlay for dead cells. Scale: 100 μm .

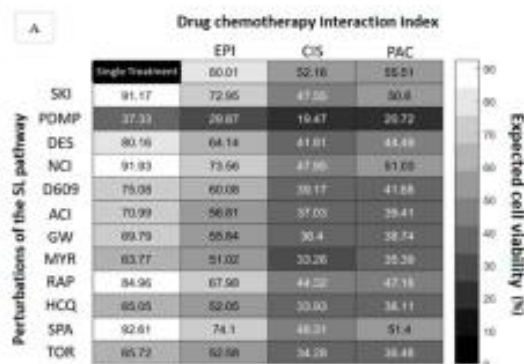


Figure 2. Cont.

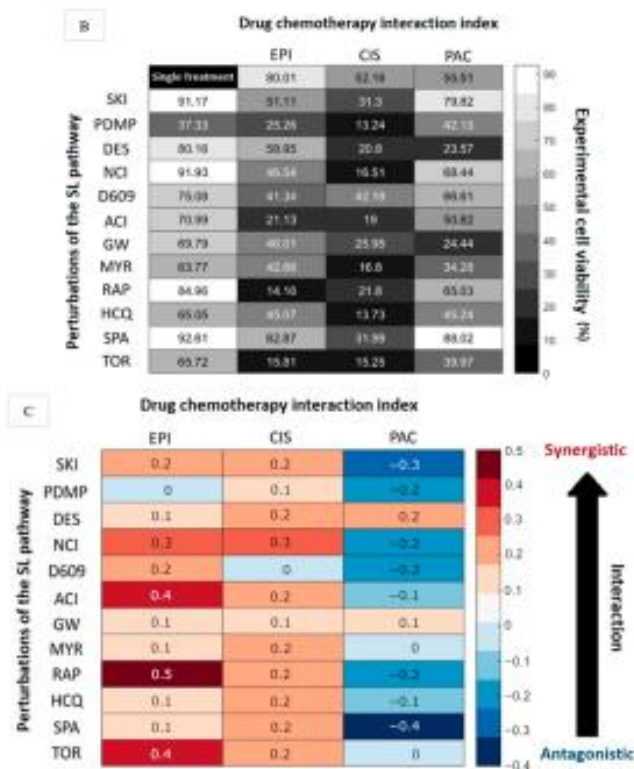


Figure 2. Cell viability analysis at 48 h from the A549 cell line (WT) enables the recognition of chemotherapy-inhibitor interactions. (A) Percentage of expected cell viability for single and double treatments; (B) percentage of experimental cell viability for single and double treatments; (C) synergistic and antagonistic interactions of chemotherapeutic drugs and perturbations of the SL pathway. EPI: Epirubicin; CIS: Cisplatin; PAC: Paclitaxel; SKI: Sphingosine kinase II inhibitor; PDMP: Glucosyl ceramide synthase inhibitor; DES: Desipramine, acid sphingomyelinase inhibitor and acid ceramidase; NCI: Neutral/alkaline ceramidase inhibitor; D609: Sphingomyelin synthase inhibitor; ACI: Acid ceramidase inhibitor; GW: Neutral sphingomyelinase inhibitor; MYR: Myricocin, serine palmitoyltransferase inhibitor; RAP: Rapamycin; HCQ: Hydroxychloroquine-1; SPA: Spautin-2; TOR: Torin-2.

2.5. Model Topology for the Metabolic Fate of SM-BOD

A support vector machine algorithm in R Studio 8.13 Software was applied to reduce the features related to the fluorescence probe and nuclear attributes from the experimental protocol. The algorithm allowed the extraction and organization of the features according to the significance level.

With the selected features, a Gaussian Mixture Model (GMM, Figure 3) was applied in the MATLAB 9.8 software [23] to identify the behavior of chemotherapeutic drugs on the SL pathway, comparing their effect on the cellular heterogeneity profile with the effect produced by known inhibitors of the SL metabolic pathway [43].

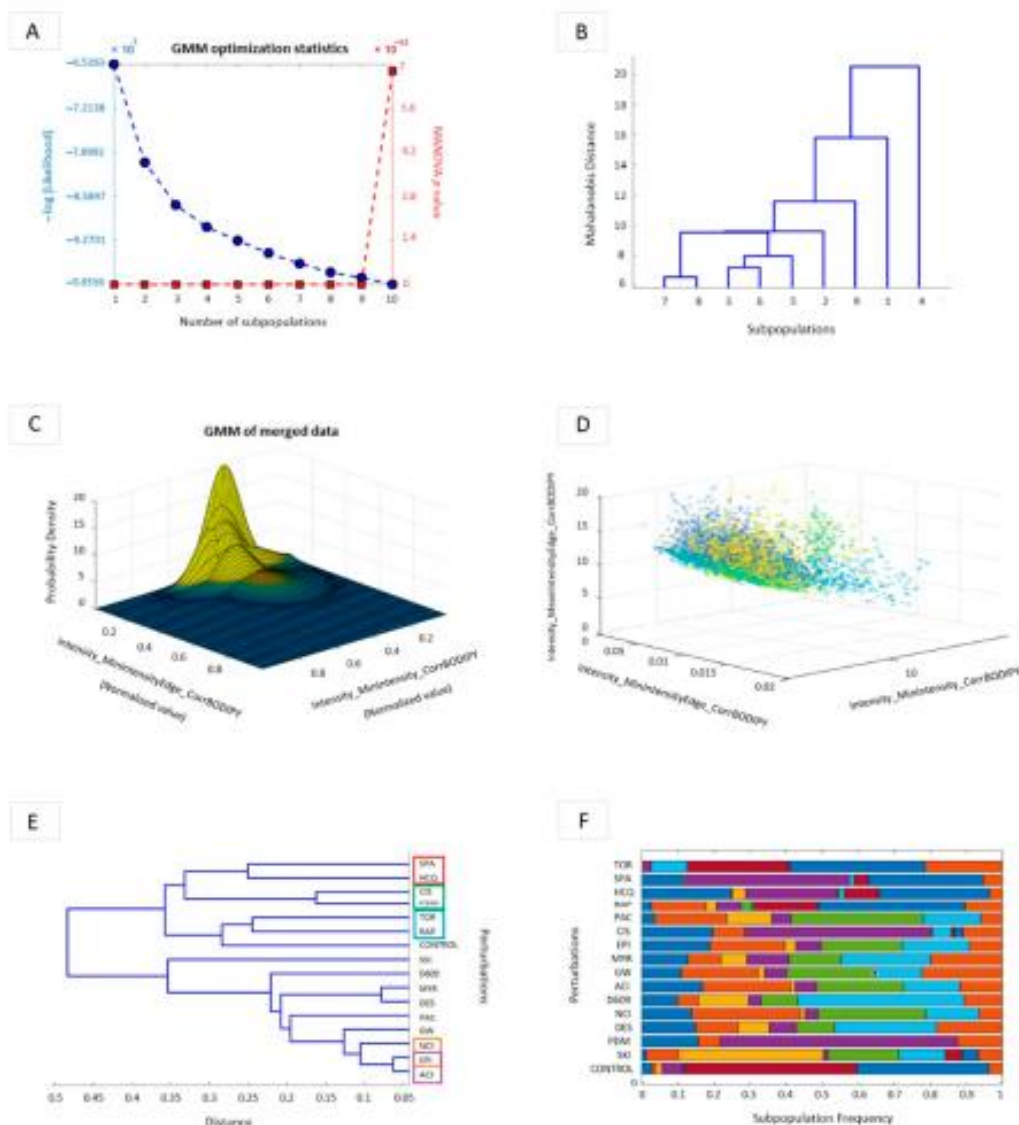


Figure 3. The Gaussian Mixture Model (GMM) enables the association of perturbations, potentially explaining synergistic interactions. (A) GMM statistical optimization using MANOVA (p -value) and $-\log(\text{likelihood})$ parameters. (B) Selected-subpopulations interactions. (C) Gaussian Mixture Model plot of merged data. (D) Cell sub-population classification in a 3D plot. (E) Dendrogram plot. The enclosed pairs are the interactions of interest. (F) Subpopulation frequency related to the perturbations applied. The different colors presented correspond to different cell subpopulations.

The cellular heterogeneity profile provided the information to perform clusters and to associate different perturbations in a dendrogram, in which it was possible to define double

interactions to identify synergisms and antagonisms. That profile allows us to infer how the chemotherapeutic agents and inhibitors perturb the SL pathway for proposing a network topology of the SL pathway for the A549 lung cancer cell line based on the metabolism of the SM-BOD probe (Figure 4).

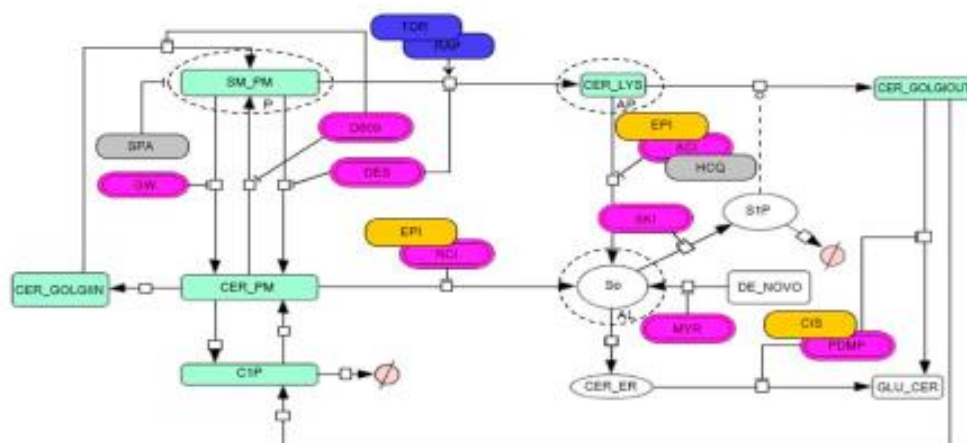


Figure 4. Model topology for the A549 lung cancer cell line of the metabolic fate of a fluorescent sphingomyelin analog (SM-BOD) with the autophagic process (dotted circles; P: phagophore, AP: autophagosome and AL: autophagolysosome) allows inferring how the different chemotherapeutic agents and inhibitors perturb the SL pathway.

3. Results

3.1. Chemotherapy Interacts with Autophagy Modulators and Inhibitors of the Sphingolipid Pathway to Modify Cytotoxicity

To develop the kinetic assays for feature extraction with single-cell resolution, we designed a protocol of image segmentation to evaluate the effect of single and double perturbations of the SL pathway (inhibitors or autophagy modulators and chemotherapeutic drugs) in single cells, using the CellProfiler software. Figure 1 shows the segmented images using fluorescence microscopy for the lung cancer cell model; cell nuclei recognized with Hoechst and propidium iodide (PI) probes (Figure 1A) and the presence of fluorescent sphingomyelin probe that was analyzed in the GFP channel (shown in Figure 1B), both enabled us to analyze cell viability as it is shown in Figure 1C. These results suggest perturbation-associated changes in the SL metabolism that can be monitored with single-cell resolution, using a PI probe to report cell death and a sphingomyelin fluorescent analog to track SL metabolism.

Then, we calculated cell viability from the image data of the single and double interactions of the previous kinetic assays (Sections 2 and 2.4, Equations (1)–(5)). The expected viability and experimental viability data are shown in Figure 2A,B, respectively, to identify synergistic and antagonistic interactions for double treatments of chemotherapy-inhibitor perturbations (Figure 2C).

The results associated with EPI indicate that the chemotherapy-modulator interaction of EPI with RAP showed an important synergism leading to a decrease in viability to 14% (Figure 2B) compared to the expected combined viability without interaction of around 67% (Figure 2A). According to these data, we obtained a synergistic effect of 0.5-fold, the higher interaction reported in our results. Additionally, the synergism of EPI-TOR and EPI-ACI was 0.4 for both cases, and the interaction of EPI-NCI was 0.3. In this way, we suggest that the mechanism of action of EPI interacts at the pathway level with the mTOR inhibitor

protein (TOR-RAP) and with the ceramidase inhibitor (ACI-NCI), leading to a significant synergistic effect. Several weaker synergistic interactions were reported for EPI with SKI, DES, D609, GW, MYR, HCQ, and SPA. The double treatment of EPI-PDMP reported no interaction, and no antagonism was observed in our results for epirubicin.

In addition, the chemotherapeutic drug cisplatin (CIS) showed the main synergism with the neutral ceramidase inhibitor (NCI) of a 0.3-fold increase compared to the expected cytotoxicity; the other conditions showed weaker synergistic interactions. A no-interaction result was obtained for CIS-D609, and no antagonism was reported in our results.

The analysis with paclitaxel (PAC) demonstrated that most interactions showed antagonistic effects, with the strongest antagonistic interaction reported to be -0.4 with SPA. Two weak synergisms with DES and GW (0.2 and 0.1, respectively) were also detected.

3.2. A GMM Model of Heterogeneity Profiles of the Metabolic Fate of a Fluorescent Sphingomyelin Analog Suggests the Mechanistic Base of the Synergistic Interactions Mapped to the SL Pathway

A support vector machine algorithm (R Software) was applied to select and organize the features extracted from the imaging analysis (Sections 2 and 2.5). A Gaussian Mixture Model (GMM, MATLAB Software) was performed to establish a heterogeneity profile to infer the effect of unknown perturbations on the SL pathway (chemotherapy). We used 109 selected fluorescence features out of 153 total features extracted by imaging. The cellular datasets for all conditions were merged into a single dataset to identify the maximum number of normally distributed subpopulations [43] (Figure 3A–D). For this purpose, we identified an optimal number of nine significant subpopulations by MANOVA test ($p < 0.5$, Figure 3A,B). Thereby, a heterogeneity profile showed the frequency of cells (Figure 3F) clustering to each of those subpopulations with the profile produced by a known perturbation (Figure 3E). EPI-ACI, EPI-NCI, CIS-PDMP, HQC-SPA, and RAP-TOR were the chemotherapy-inhibitor interactions that could be mapped together due to the similarities in their heterogeneity profiles. This enabled us to suggest that the influence of those chemotherapeutic agents on the metabolic pathway of SM-BOD is like those corresponding inhibitors of the SL-pathway enzymes.

Next, we propose a network topology of the SL pathway for the A549 lung cancer cell line (Figure 4) based on the metabolism of the SM-BOD probe that we described in previous studies [44,45]; the green boxes represent the fluorescent metabolites, the white ones indicate loss of fluorescence and magenta boxes are the enzymes-inhibitors of the SL pathway. We coupled this model topology of the autophagic process with its main steps enclosed in dotted circles (P: phagophore, AP: autophagosome, and AL: autophagolysosome).

According to the results obtained from the GMM, we associated the chemotherapy-inhibitor pairs (obtained from Sections 3 and 3.2) to map their interactions to the SL pathway. The yellow boxes represent the chemotherapeutic drugs sensed according to the clusters identified on the dendrogram plot (Figure 3E), which were EPI-NCI, EPI-ACI, and CIS-PDMP. RAP-TOR and SPA-HCQ autophagy modulators (blue and grey boxes, respectively; Figure 4) were associated. Still, it was impossible to map them to a known perturbation within the SL pathway. Taken together, those results suggest that the chemotherapeutic treatments perturb the SL pathway similarly to their corresponding known inhibitors.

Furthermore, our model topology suggests potential mechanisms of those double perturbations identified to have synergistic effects in cytotoxicity. The EPI-ACI and EPI-NCI pairs potentially inhibit the synthesis of sphingosine (So) and enhance the concentration of ceramide (Cer) in different cellular compartments. The inhibition of neutral ceramidase by the EPI-NCI pair potentially increases the Cer content locally at the plasma membrane (CER_{PM}). Meanwhile, the inhibition of acid ceramidase enzyme by EPI-ACI interaction leads to Cer accumulation in the lysosomal compartment. Moreover, the interaction of CIS-PDMP potentially inhibits the glucosylceramide synthase to avoid the synthesis of glucosylceramide (GLU_{CER}), leading to an increase in Cer in the endoplasmic reticulum and on the cytosolic side of the Golgi compartment.

Our model topology also suggests that the interactions of chemotherapy with TOR or RAP autophagy inducers stimulate the formation of autophagosomes to move cellular material (including sphingolipids) from the plasma membrane (SM_PM) to the lysosomal compartment (CER_LYS).

Like the aforementioned, the cluster of the autophagy inhibitors SPA-HCQ did not map to any known perturbation of the SL pathway. According to our network model, SPA inhibits the formation of the phagophore in the plasma membrane, and interestingly, HCQ shows similar behavior to ACI, thereby inhibiting the acid ceramidase enzyme, potentially preventing the formation of autophagolysosomes.

These results indicate that the heterogeneity profiles obtained from a GMM model of the image features derived from the metabolic fate of a fluorescent sphingomyelin analog enable the mapping of the influences of single perturbations on the SL pathway. This topological mapping also enables us to suggest the mechanistic base of the synergistic interactions between chemotherapeutic drugs and known perturbations of autophagy and SL pathway.

3.3. *mCherry-EGFP-LC3B and SM-BOD Cell Labeling Show That the Interactions of Epirubicin with Torin and Rapamycin Stimulate the Accumulation of Autophagosomes*

According to our model topology, we hypothesized that interactions of chemotherapeutic drugs with the autophagy inducers TOR and RAP lead to an increase in vesicles potentially associated with the local accumulation of ceramide in those compartments (Figure 4). In order to confirm that hypothesis, we designed a composite image of control, double, and single perturbations for the interactions of EPI-RAP and EPI-TOR in stable A549 *mCherry-EGFP-LC3B* cells labeled with SM-BOD (Figure 5) in order to visualize the presence of fluorescently labeled (SL-loaded) autophagosomes for our experimental conditions, using fluorescence microscopy.

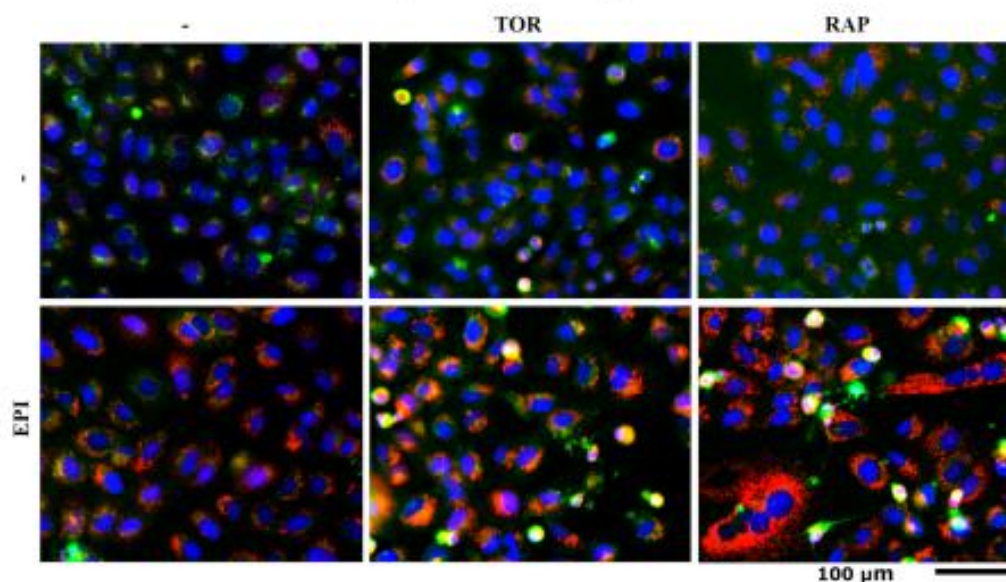


Figure 5. Kinetic analysis evidences the autophagy by increasing the autophagosome content for the selected synergistic conditions at 24 h for the A549 *mCherry-EGFP-LC3B* cells using fluorescence microscopy. Imaging composite of control, single perturbations of EPI, RAP, and TOR, and double perturbations of EPI-RAP and EPI-TOR. Scale: 100 μ m.

The composite image of the A549 mCherry-EGFP-LC3B cells (Figure 5) indeed shows a significant increase in vesicles (the dotted pattern) for both synergistic conditions of EPI-RAP and EPI-TOR compared to their corresponding single perturbations and control at 24 h. These results unveil a potential mechanism of synergism by the combination of autophagy inducers with inhibitors of lysosomal sphingolipid metabolism (or chemotherapeutic drugs with a similar effect), leading to a local increase in sphingolipids in those autophagosomal compartments inducing cell death.

4. Discussion

Sphingolipids are essential structural components of biological membranes and are crucial regulators of cellular processes [49]. Some SLs behave as second messengers involved in cell fate decisions, such as Cer (involved in cell death) and S1P (promotes cell survival) [50]. In the present work, a fluorescent sphingomyelin analog probe enabled cell segmentation by imaging and the determination of the level of chemosensitivity in the A549 lung cancer cell line treated with different perturbations of the SL pathway. The cell viability analysis defined the synergistic interactions that enhance or reduce the cytotoxic effect on this cell line. Furthermore, we proposed a model topology with mapped perturbations of the identified synergies to propose potential mechanisms explaining the metabolic fate of the fluorescent biosensor. In addition, the composite images of the kinetic assays evidence the perturbation to the autophagic process for some specific conditions where an increase in autophagosomes is observed with a concomitant colocalization of fluorescent SL.

The BODIPY is characterized as being one of the most useful fluorophores due to its chemical and thermal stability and its properties as a fluorescent sensor to interact directly with different proteins and peptides [51]. We suggest that the use of BODIPY to label a sphingolipid analog and track their cell metabolism is a promising strategy to find synergistic interactions between chemotherapeutic agents and autophagy modulators or inhibitors of the SL pathway to enhance or reduce cytotoxicity.

The SM-BOD sensor is located mainly in the plasma membrane. As time goes on, it is internalized toward the Golgi apparatus, increasing the signal at the perinuclear zone and the affinity of Cer to this organelle (mediated by the interconversion from SM to Cer) [52], which confirms the potential of SM-BOD to track the sphingolipid metabolism in cells (Figure 1). According to the synergies found in our results (Figures 2 and 3), we proposed a cellular model for the A549 lung cancer cell line to analyze the SM-BOD metabolism, including autophagic compartments, to dissect the interaction between those two important cellular processes in the context of double perturbations including chemotherapy and autophagy modulators (Figure 4).

The anthracycline EPI is a DNA-intercalating genotoxic drug used for cancer treatments [53], including lung cancer. This chemotherapeutic drug has many side effects related to its high toxicity and the emergence of chemoresistant neoplastic clones. Interestingly, anthracycline resistance is associated with an adjustment in the metabolism of lipids and the autophagic process [54,55]. In addition, EPI treatment modulates the SL metabolic pathway and regulates autophagy in a cell type-specific manner [53,56]; previous reports described that anthracyclines trigger the cell death process by stimulating the production of Cer [57].

After the evaluation of the postulated interactions among different perturbations, we identified that EPI presents an important synergism with TOR and RAP, which are autophagy inducers. Therefore, our mathematical model indicates that those perturbations inhibit the formation of So but increase the Cer content (as shown in Figure 4). Based on scientific reports, both RAP and TOR stimulate autophagy by inhibiting the mTOR protein complex, thereby increasing the transport of cellular materials from the plasma membrane to the lysosome, including sphingolipids such as the SM-BOD [31]. That information agrees with our results because of the increase in the autophagosomal compartment (vesicles) for those conditions, indicating that the autophagic process is active and suggesting colo-

calization of sphingolipids (potentially Cer) in the autophagosomes due to EPI-TOR and EPI-RAP synergisms in the A549 cell line (Figure 5).

Furthermore, we reported that EPI has synergistic interactions with the acid (ACI) and neutral (NCI) ceramidase inhibitors (Figure 2). In fact, the dendrogram shows that EPI has a similar behavior as ACI and NCI (Figure 3E). However, the perturbations of ACI could also lead to pathological changes in the absence of Cer accumulation and lead to changes in gene expression within the sphingolipid pathway [58].

Autophagic formation is a very complex process with new adaptor molecules discovered to mediate cell death and tumor metastasis [59]. Autophagy is a deep and complex process which describes initiation, nucleation, elongation, maturation, fusion, and degradation [60]. Autophagosomes are fused with lysosomes to form autophagolysosomes, which degrade their content (organelles and proteins) in order to keep the cell homeostasis and organelle renewal. The regulatory mechanisms of autophagy are complex, and its upstream signaling pathway mainly involves an mTOR-dependent pathway and mTOR-independent pathway (AMPK, PI3K, Ras-MAPK, p53, PTEN, and endoplasmic reticulum stress) [61].

Moreover, studies have demonstrated that the sphingolipids modulate autophagy. Reports indicate that the exposure of cancer cell lines to chemotherapeutic treatments increases Cer content [50]. Cer induces autophagy via three mechanisms: (i) the direct anchoring of autophagosomes to mitochondria [62], (ii) the down-regulation of nutrient transporters [63], and (iii) the disruption of the Beclin-Bcl-2 complex (an autophagy inhibitor) [64,65]. During autophagy, cytoplasmic constituents (protein and organelles) are engulfed in a double-membraned phagophore; once the double membrane fuses and the autophagosome matures, it is transported along tubulin tracks to a perinuclear location, fusing with a lysosome which generates an autolysosomal structure capable of degrading its content [29]. The above agrees with the mapping site of the autophagic process on the model topology shown in Figure 4, in which Cer accompanies the accumulation of autophagosomes. Furthermore, Figure 5 shows the colocalization of sphingolipids (presumably Cer) at the lysosome level (vesicles), suggesting that the enhancement in autophagosome formation by TOR and RAP and the interruption of autophagosome degradation by EPI leads to a local accumulation of sphingolipids potentially triggering cell death.

Withstanding the fact that our *in silico* model (shown in Figure 4) describes that the interaction of EPI-TOR and EPI-RAP promotes an accumulation of Cer in autophagosomes, our results of the kinetic analysis (Figure 5) show an important colocalization of SL (potentially Cer) in autophagosomes. Further studies are required to determine the identity of the sphingolipids accumulating within those growing autophagosomes under conditions where the autophagosomal and SL degradation are blocked.

As a potent bioactive sphingolipid implicated in the regulation of cancer progression and cellular proliferation, S1P receptors are involved in controlling tumor response to chemotherapy. S1P receptors are crucial regulators of cancer cell survival and proliferation via activation of key pathway clusters such as Ras/Erk and PI3 K/Akt [34,66]. Due to its role in the activation of autophagy, S1P and the expression of its receptors are also involved in the transactivation of growth factor signaling mechanisms, which could be a potentially interesting direction for further studies as a novel treatment approach.

On the other hand, the chemotherapy CIS is implied in death cells in pathways regulated by sphingolipids, in which CIS increases the ceramide content [67]. In agreement with that information, our data show that the CIS drug has the main synergism with NCI (Figure 2), and in our model, it was mapped with PDMP (a glucosylceramide synthase inhibitor, Figure 4). This interaction would increase the Cer content in the cytosolic region of the Golgi apparatus (CER_GOLGIOUT), avoiding glycosylation and its conversion to So at the plasma membrane [43]. Based on Dupre et al. (2017), the administration of PDMP to lung cancer cells stimulates endoplasmic reticulum stress (ER stress), autophagy, and apoptosis as a result of PDMP-induced ceramide accumulations [67].

Besides the aforementioned, studies have demonstrated that PAC increases Cer content and stimulates the expression of sphingomyelinases, so that PAC promotes the hydrolysis of

sphingomyelin [68]. In our results, PAC chemotherapy was able to perturb the SL pathway. Still, it could not be mapped to any known inhibitor, meaning it probably perturbs the SL pathway differently than the inhibitors used in this study. It is important to consider that the model simplifies a more complex pathway with a limited number of inhibitors.

Previous reports indicate that SPA inhibits autophagy and avoids phagophore formation [69]. Meanwhile, HCQ inhibits autophagy due to lysosomal acidification and blocks the fusion of autophagosomes with lysosomes, triggering the accumulation of autophagosomes [70]. In contrast, our experimental data show that HCQ and SPA were mapped together in the same cluster, suggesting that they acted similarly for this cellular model. A possible explanation for this discrepancy is that both perturbations have similar consequences at the signal transduction level, and it was therefore impossible for the algorithm to separate and map them correctly. In consequence, our model shows that SPA was mapped inhibiting the phagophore, and HCQ was mapped together with ACI because the inhibition of the autophagolysosome acidification would not allow it to reach the optimal pH for the correct activation of acid ceramidases; therefore, it would have a similar role compared to this inhibitor [71] (Figure 4).

5. Conclusions

Chemotherapy is commonly used to treat cancer, but it has limited survival benefits due to its high toxicity [72] and the pharmacological resistance due to neoplastic development. Our study was based on the characterization of tumor heterogeneity as a tool to map the critical importance of sphingolipids in cell fate and stress signaling. Based on the results obtained from this work, we suggest a strategy for combinatorial drug treatment aimed at increasing the levels of anti-tumoral sphingolipids in critical compartments, leading to synergistic interactions to enhance the anti-neoplastic effects of chemotherapy.

The use of fluorescent sphingolipid analogs and molecular sensors of autophagy provided valuable insights into the cytotoxic interactions of various chemotherapeutic agents, including epirubicin, cisplatin, and paclitaxel, in combination with inhibitors of the sphingolipid pathway and autophagy modulators. Our results revealed significant synergy, particularly between epirubicin and autophagy inducers (rapamycin and Torin), leading to a strong reduction in cell viability. Cisplatin also demonstrated synergistic effects when combined with a ceramidase inhibitor. However, paclitaxel often exhibited antagonistic effects when used in combination with these modifiers.

The model we proposed provided critical insights into the influence of chemotherapy on the sphingolipid pathway, suggesting that combining chemotherapies with autophagy inducers increases vesicle formation, potentially linked to ceramide accumulation, which triggers cell death.

Via an analysis of sphingolipid metabolism and autophagic flux in the context of chemotherapeutic interactions using an A549 lung cancer model, our results establish the basis for the design of new therapeutic protocols with potential clinical applications with the aim to enhance chemosensitivity in heterogeneous tumors and thus improve the efficiency and efficacy of cancer treatments.

Author Contributions: Conceptualization, S.Q. and R.M.-R.; methodology, S.M.-P. and A.R.-C.; software, J.A.M.-M. and R.M.-R.; validation, S.Q. and F.S.; formal analysis, S.M.-P. and R.M.-R.; investigation, S.M.-P., A.R.-C. and J.A.M.-M.; resources, F.S. and R.M.-R.; data curation, S.Q. and F.S.; writing—original draft preparation, S.M.-P., A.R.-C. and R.M.-R.; writing—review and editing, F.S., S.Q., J.V.-B. and R.M.-R.; visualization, F.S.; supervision, R.M.-R.; project administration, R.M.-R.; funding acquisition, J.V.-B. and R.M.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Vicerrectoría de Investigación (University of Costa Rica) and FEES-CONARE (B3655).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Models are available upon request.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the administrative support of CICICA and CIET.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Luo, G.; Liu, N. An integrative theory for cancer (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *43*, 647–656. [CrossRef]
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the National Cancer Institute (NCI) Cancer Statistics at a Glance. Available online: https://gis.cdc.gov/Cancer/USCS/?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcancer%2Fdataviz%2Findex.htm#/AtAGlance/ (accessed on 28 August 2023).
- Urruticoechea, A.; Alemany, R.; Balart, J.; Villanueva, A.; Vinals, F.; Capellá, G. Recent advances in cancer therapy: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3–10. [CrossRef]
- Cooper, G. *The Cell: A Molecular Approach*, 5th ed.; Sinauer Associate: Sunderland, MA, USA, 2010.
- Yamamoto, Y.; Kasashima, H.; Fukui, Y.; Tsujio, G.; Yashiro, M.; Maeda, K. The heterogeneity of cancer-associated fibroblast subpopulations: Their origins, biomarkers, and roles in the tumor microenvironment. *Cancer Sci.* **2023**, *114*, 16–24. [CrossRef]
- Dagogo-Jack, I.; Shaw, A.T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 81–94. [CrossRef]
- Slack, M.D.; Martinez, E.D.; Wu, L.F.; Altschuler, S.J. Characterizing heterogeneous cellular responses to perturbations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19306–19311. [CrossRef]
- Kitano, H. Cancer as a robust system: Implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 227–235. [CrossRef]
- Yabo, Y.A.; Niclou, S.P.; Golebiewska, A. Erratum: Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro-Oncology* **2022**, *24*, 669–682. [CrossRef]
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L. *Molecular Cell Biology*; W. H. Freeman: New York, NY, USA, 2000.
- Knizhnik, A.V.; Roos, W.P.; Nikolova, T.; Quiros, S.; Tomaszowski, K.H.; Christmann, M.; Kaina, B. Survival and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55665. [CrossRef]
- Lemjabbar-Alaoui, H.; Hassan, O.U.J.; Yang, Y.W.; Buchanan, P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim. Biophys. Acta—Rev. Cancer* **2015**, *1856*, 189–210. [CrossRef]
- Lung Cancer Research Foundation Facts About Lung Cancer. Available online: <https://www.lungcancerresearchfoundation.org/lung-cancer-facts/> (accessed on 28 August 2023).
- Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 175–191. [CrossRef]
- Dubin, S.; Griffin, D. SCINCe OF MeDICine lung cancer in non-smokers. *Source Med.* **2020**, *117*, 300–375.
- Futerman, A.H.; Hannun, Y.A. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 777–782. [CrossRef] [PubMed]
- Tirodkar, T.S.; Voelkel-Johnson, C. Sphingolipids in apoptosis. *Exp. Oncol.* **2012**, *34*, 231–242. [PubMed]
- Ogretmen, B. Sphingolipids in cancer: Regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5467–5476. [CrossRef] [PubMed]
- Mullen, T.D.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* **2012**, *441*, 789–802. [CrossRef] [PubMed]
- Sukocheva, O.A.; Furuya, H.; Ng, M.L.; Friedemann, M.; Menschikowski, M.; Tarasov, V.V.; Chubarev, V.N.; Klochkov, S.G.; Neganova, M.E.; Mangoni, A.A.; et al. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate receptor signaling pathway in inflammatory gastrointestinal disease and cancers: A novel therapeutic target. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *207*, 107464. [CrossRef]
- Gomez-Larrauri, A.; Presa, N.; Dominguez-Herrera, A.; Ouro, A.; Trueba, M.; Gomez-Muñoz, A. Role of bioactive sphingolipids in physiology and pathology. *Essays Biochem.* **2020**, *64*, 579–589. [PubMed]
- Gómez-Muñoz, A. Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochim. Biophys. Acta—Biomembr.* **2006**, *1758*, 2049–2056. [CrossRef]
- Mora, R.; Dokic, I.; Kees, T.; Hüber, C.M.; Keitel, D.; Geibig, R.; Brüggel, B.; Zentgraf, H.; Brady, N.R.; Régnier-Vigouroux, A. Sphingolipid rheostat alterations related to transformation can be exploited for specific induction of lysosomal cell death in murine and human glioma. *Glia* **2010**, *58*, 1364–1383. [CrossRef]
- Fernandis, A.Z.; Wenk, M.R. Lipid-based biomarkers for cancer. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 2830–2835. [CrossRef]
- Young, M.M.; Kester, M.; Wang, H.G. Sphingolipids: Regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 5–19. [CrossRef] [PubMed]
- Morad, S.A.F.; Cabot, M.C. *The Onus of Sphingolipid Enzymes in Cancer Drug Resistance*; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 140, ISBN 9780128142233.
- Iessi, E.; Marconi, M.; Manganeli, V.; Sorice, M.; Malorni, W.; Garofalo, T.; Matarrese, P. *On the Role of Sphingolipids in Cell Survival and Death*, 1st ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Volume 351, ISBN 9780128201336.
- Li, Y.; Li, S.; Qin, X.; Hou, W.; Dong, H.; Yao, L.; Xiong, L. The pleiotropic roles of sphingolipid signaling in autophagy. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1245. [CrossRef] [PubMed]

29. Lai, M.; La Rocca, V.; Amato, R.; Freer, G.; Pistello, M. Sphingolipid/ceramide pathways and autophagy in the onset and progression of melanoma: Novel therapeutic targets and opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3436. [\[CrossRef\]](#)
30. Zheng, W.; Kollmeier, J.; Symolon, H.; Momin, A.; Munter, E.; Wang, E.; Kelly, S.; Allegood, J.C.; Liu, Y.; Peng, Q.; et al. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta—Biomembr.* **2006**, *1758*, 1864–1884. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Harvald, E.B.; Olsen, A.S.B.; Færgeman, N.J. Autophagy in the light of sphingolipid metabolism. *Apoptosis* **2015**, *20*, 658–670. [\[CrossRef\]](#)
32. Young, M.M.; Wang, H.G. Sphingolipids as Regulators of Autophagy and Endocytic Trafficking. *Adv. Cancer Res.* **2018**, *140*, 27–60.
33. Yamagata, M.; Obara, K.; Kihara, A. Sphingolipid synthesis is involved in autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *410*, 786–791. [\[CrossRef\]](#)
34. Ghosal, P.; Sukocheva, O.A.; Wang, T.; Mayne, G.C.; Watson, D.I.; Hussey, D.J. Effects of chemotherapy agents on Sphingosine-1-Phosphate receptors expression in MCF-7 mammary cancer cells. *Biomol. Pharmacother.* **2016**, *81*, 218–224. [\[CrossRef\]](#)
35. Karunakaran, I.; Alam, S.; Jayagopi, S.; Frohbeniger, S.J.; Hansen, J.N.; Kuehlwein, J.; Höbbling, B.V.; Schumak, B.; Hübner, M.P.; Gräler, M.H.; et al. Neural sphingosine 1-phosphate accumulation activates microglia and links impaired autophagy and inflammation. *Glia* **2019**, *67*, 1859–1872. [\[CrossRef\]](#)
36. Goel, K.; Beatman, E.L.; Egersdorf, N.; Scruggs, A.; Cao, D.; Berdyshev, E.V.; Schweitzer, K.S.; Petrache, I. Sphingosine 1 phosphate (S1p) receptor 1 is decreased in human lung microvascular endothelial cells of smokers and mediates s1p effect on autophagy. *Cells* **2021**, *10*, 1200. [\[CrossRef\]](#)
37. Lee, J.K.; Jin, H.K.; Park, M.H.; Kim, B.R.; Lee, P.H.; Nakauchi, H.; Carter, J.E.; He, X.; Schuchman, E.H.; Bae, J.S. Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 1551–1570. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Marks, D.L.; Bittman, R.; Pagano, R.E. Use of bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells. *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 819–832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Klionsky, D.J.; Abeliovich, H.; Agostinis, P.; Agrawal, D.K.; Aliev, G.; Askew, D.S.; Baba, M.; Baehrecke, E.H.; Bahr, B.A.; Ballabio, A.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **2008**, *4*, 151–175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Tyteca, D.; D'Auria, L.; Van Der Smissen, P.; Medts, T.; Carpentier, S.; Monbaliu, J.C.; de Diesbach, P.; Courttoy, P.J. Three unrelated sphingomyelin analogs spontaneously cluster into plasma membrane micrometric domains. *Biochim. Biophys. Acta—Biomembr.* **2010**, *1798*, 909–927. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Fan, W.; Tang, S.; Fan, X.; Fang, Y.; Xu, X.; Li, L.; Xu, J.; Li, J.L.; Wang, Z.; Li, X. SIRT1 regulates sphingolipid metabolism and neural differentiation of mouse embryonic stem cells through α -Myo-SMPDL3B. *Elife* **2021**, *10*, e67452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Molina-Mora, J.A.; Mora-Rodríguez, R.A. Identification of cancer chemosensitivity by ODE and GMM modeling of heterogeneous cellular response to perturbations in fluorescent sphingolipid metabolism. In Proceedings of the 2016 IEEE 36th Central American and Panama Convention CONCAPAN 2016, San Jose, Costa Rica, 9–11 November 2016.
43. Molina-Mora, J.A.; Kop-Montero, M.; Quirós-Fernández, I.; Quiros, S.; Crespo-Mariño, J.L.; Mora-Rodríguez, R.A. A hybrid mathematical modeling approach of the metabolic fate of a fluorescent sphingolipid analogue to predict cancer chemosensitivity. *Comput. Biol. Med.* **2018**, *97*, 8–20. [\[CrossRef\]](#)
44. Quiros-Fernandez, I.; Molina-Mora, J.; Kop-Montero, M.; Salas-Hidalgo, E.; Mora-Rodríguez, R. Predicting Cancer Chemosensitivity Based on Intensity/Distribution Profiles of Cells Loaded with a Fluorescent Sphingolipid Analogue. In Proceedings of the 2018 IEEE International Work Conference on Bioinspired Intelligence (IWOBI), San Carlos, Costa Rica, 18–20 July 2018; IEEE: Piscataway, NJ, USA, 2018; pp. 1–8.
45. Molina-Mora, J.A.; Mesen-Porras, S.; Quiros-Fernandez, I.; Kop-Montero, M.; Rojas-Cespedes, A.; Quiros, S.; Siles, F.; Mora, R. Sphingolipid pathway as a biosensor of cancer chemosensitivity: A proof of principle. *Umicencia* **2022**, *36*, 687–701. [\[CrossRef\]](#)
46. N'Diaye, E.N.; Kajihara, K.K.; Hsieh, I.; Morisaki, H.; Debnath, J.; Brown, E.J. PLIC proteins or ubiquitins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 173–179. [\[CrossRef\]](#)
47. Naviaux, R.K.; Costanzi, E.; Haas, M.; Verma, I.M. The pCL vector system: Rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* **1996**, *70*, 5701–5705. [\[CrossRef\]](#)
48. Muñoz-Cuevas, J.H. Sinergia y adición en anestesiología. *Rev. Mex. Anestesiol.* **2011**, *34*, 195–199.
49. Haberkant, P.; Stein, F.; Höglinger, D.; Gerl, M.J.; Brügger, B.; Van Veldhoven, P.P.; Krijgsveld, J.; Gavin, A.C.; Schultz, C. Bifunctional Sphingosine for Cell-Based Analysis of Protein-Sphingolipid Interactions. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 222–230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Lavieu, G.; Scarlatti, F.; Sala, G.; Levade, T.; Ghidoni, R.; Botti, J.; Codogno, P. Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision? *Autophagy* **2007**, *3*, 45–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Jameson, L.P.; Smith, N.W.; Annunziata, O.; Dzyuba, S.V. Interaction of BODIPY dyes with bovine serum albumin: A case study on the aggregation of a click-BODIPY dye. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 14182–14185. [\[CrossRef\]](#)
52. Koivusalo, M.; Jansen, M.; Somerharju, P.; Ikonen, E. Endocytic Trafficking of Sphingomyelin Depends on Its Acyl Chain Length. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 3250–3263. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

53. Weigel, C.; Hüttner, S.S.; Ludwig, K.; Krieg, N.; Hofmann, S.; Schröder, N.H.; Robbe, L.; Kluge, S.; Nierhaus, A.; Winkler, M.S.; et al. SIP lyase inhibition protects against sepsis by promoting disease tolerance via the SIP/S1PR3 axis. *EBioMedicine* **2020**, *58*, 102898. [\[CrossRef\]](#)
54. Sala, V.; Della Sala, A.; Hirsch, E.; Ghigo, A. *Signaling Pathways Underlying Anthracycline Cardiotoxicity*; Mary Ann Liebert, Inc.: Larchmont, NY, USA, 2020; Volume 32, ISBN 3901167064.
55. Russo, M.; Della Sala, A.; Tocchetti, C.G.; Porporato, P.E.; Ghigo, A. Metabolic Aspects of Anthracycline Cardiotoxicity. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2021**, *22*, 18. [\[CrossRef\]](#)
56. Blaho, V.A. Sphingosine 1-phosphate escapes the Catch-22 of sepsis prevention and mitigation therapies. *EBioMedicine* **2020**, *59*, 102952. [\[CrossRef\]](#)
57. Capelôa, T.; Benyahia, Z.; Zampieri, L.X.; Blackman, M.C.N.M.; Sonveaux, P. Metabolic and non-metabolic pathways that control cancer resistance to anthracyclines. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2020**, *98*, 181–191. [\[CrossRef\]](#)
58. Kyriakou, K.; Lederer, C.W.; Kleanthous, M.; Drousiotou, A.; Malekkou, A. Acid ceramidase depletion impairs neuronal survival and induces morphological defects in neurites associated with altered gene transcription and sphingolipid content. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1607. [\[CrossRef\]](#)
59. Sun, X.; Zhou, L.; Wang, X.; Li, Y.; Liu, X.; Chen, Y.; Zhong, Z.; Chen, J. FYCO1 regulates migration, invasion, and invadopodia formation in HeLa cells through CDC42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway. *Biochem. Cell Biol.* **2022**, *100*, 458–472. [\[CrossRef\]](#)
60. Li, X.; He, S.; Ma, B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol. Cancer* **2020**, *19*, 12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Cao, W.; Li, J.; Yang, K.; Cao, D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull. Cancer* **2021**, *108*, 304–322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Sentelle, R.D.; Senkal, C.E.; Jiang, W.; Ponnusamy, S.; Gencer, S.; Panneer Selvam, S.; Ramshesh, V.K.; Peterson, Y.K.; Lemasters, J.J.; Szulc, Z.M.; et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 831–838. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Peralta, E.R.; Edinger, A.L. Ceramide-induced starvation triggers homeostatic autophagy. *Autophagy* **2009**, *5*, 407–409. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Alexaki, A.; Gupta, S.; Majumder, S.; Kono, M.; Tuymetova, G.; Harmon, J.; Dunn, T.; Proia, R. Autophagy regulates sphingolipid levels in the liver. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 2521–2531. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Scarlatti, F.; Bauvy, C.; Ventruti, A.; Sala, G.; Cluzeaud, F.; Vandewalle, A.; Ghidoni, R.; Codogno, P. Ceramide-mediated Macroautophagy Involves Inhibition of Protein Kinase B and Up-regulation of Beclin 1. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18384–18391. [\[CrossRef\]](#)
66. Pyne, N.J.; Pyne, S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 489–503. [\[CrossRef\]](#)
67. Dupre, T.V.; Doll, M.A.; Shah, P.P.; Sharp, C.N.; Slow, D.; Megyesi, J.; Shayman, J.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Beverly, L.J.; et al. Inhibiting glucosylceramide synthase exacerbates cisplatin-induced acute kidney injury. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 1439–1452. [\[CrossRef\]](#)
68. Dimanche-Boitrel, M.T.; Rebillard, A. Sphingolipids and Response to Chemotherapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2013**, *216*, 73–91.
69. Liu, J.; Xia, H.; Kim, M.; Xu, L.; Li, Y.; Zhang, L.; Cai, Y.; Norberg, H.V.; Zhang, T.; Furuya, T.; et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* **2011**, *147*, 223–234. [\[CrossRef\]](#)
70. Liu, Q.; Luo, X.Y.; Jiang, H.; Yang, M.H.; Yuan, G.H.; Tang, Z.; Wang, H. Hydroxychloroquine facilitates autophagosome formation but not degradation to suppress the proliferation of cervical cancer SiHa cells. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 1057–1062. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Xu, R.; Sun, W.; Jin, J.; Obeid, L.M.; Mao, C. Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes. *FASEB J.* **2010**, *24*, 2507–2515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Singh, J.; Luqman, S.; Meena, A. Emerging role of phytochemicals in targeting predictive, prognostic, and diagnostic biomarkers of lung cancer. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *144*, 111592. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.